

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



TESIS DOCTORAL

**Histonas del díptero "ceratitis capitata" : estudio de la
fracción F1**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Francisco Montero Carnerero

DIRECTOR:

Luis Franco

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5322351097

T1

577.1

MON

HISTONAS DEL DIPTERO "CERATITIS CAPITATA"

ESTUDIO DE LA FRACCION F1

MEMORIA

que para optar al Grado de Doctor en Ciencias Químicas

presenta

FRANCISCO MONTERO CARNERERO

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE - MADRID
Facultad de Ciencias Químicas
BIBLIOTECA
Nº Registro33127.....

Madrid, 1976

El presente trabajo se ha llevado a cabo en los laboratorios del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad Complutense, bajo la dirección del Prof. Dr. D. Luis Franco, a quien quiero expresar mi más profundo -- agradecimiento por su constante ayuda y -- atención.

Deseo también manifestar mi grati-- tud al Prof. Dr. D. Angel Martín Municio, Director del Departamento de Bioquímica, por el interés demostrado hacia el desa-- rrollo de esta investigación, del mismo -- modo que a mis compañeros de Departamento, en especial a M.C. Rojo, J. Navlet, J. Perrera, B. Fernández, I. López, R. Belmonte, J. Rodríguez y R.M. Nieto, cuya colabora-- ción y ayuda han sido muy valiosas en la realización de este trabajo.

Madrid, Abril de 1976.

"Las condiciones externas, que se manifiestan por medio de los hechos experimentales, no le permiten al científico ser demasiado estricto en la construcción de su mundo conceptual mediante la adhesión a un sistema epistemológico. Por eso tiene que aparecer ante el epistemólogo como un oportunista poco - escrupuloso"

Einstein

A B R E V I A T U R A S

=====

B/A	Relación molar entre aminoácidos básicos y aminoácidos ácidos de una proteína
DC	Dicroísmo circular
ClGu	Cloruro de guanidinio
CMC	Carboximetilcelulosa
DEAE-celulosa	Dietilaminoetilcelulosa
EDTA	Etilendiaminotetraacético
Lys/Arg	Relación Lysina/Arginina
PCA	Acido perclórico
SDS	Docecil sulfato sódico
SSC	ClNa 0.5M - citrato sódico 0.015M
TCA	Acido tricloroacético
TEMED	N, N, N', N' tetrametiletilendiamina
Tris	Tris(hidroximetil) aminometano

I N D I C E

Página

1. PARTE TEORICA

1.1. INTRODUCCION	13
1.1.1. Definición, localización celular y desarrollo histórico del estudio de las histonas	13
1.2. PREPARACION DE HISTONAS TOTALES	18
1.3. PREPARACION DE FRACCIONES DE HISTONAS ...	20
1.4. COMPLEJIDAD Y HETEROGENEIDAD DE LAS HISTONAS	22
1.4.1. Clasificación y características generales de las distintas fracciones	22
1.4.2. Variación de las distintas fracciones en especies y órganos	30
1.5. INTERACCIONES HISTONAS-DNA	35
1.6. ESTRUCTURA DE LAS NUCLEOHISTONAS	39
1.7. DIRECCION DE LA INVESTIGACION REALIZADA ..	46

2. MATERIAL Y METODOS

2.1. PREPARACION DEL MATERIAL BIOLOGICO	51
2.2. PREPARACION DE CROMATINA	51

2.3. AISLAMIENTO DE HISTONAS TOTALES	53
2.3.1. Disociación salina de la cromatina .	54
2.3.2. Extracción ácida	56
2.4. EXTRACCION SELECTIVA DE FRACCIONES	57
2.4.1. Extracción selectiva de Fl	57
2.4.2. Separación selectiva de las restantes fracciones	58
2.5. AISLAMIENTO DE DNA	60
2.6. AGREGACION DE HISTONAS	62
2.6.1. Oxidación de histonas	62
2.6.2. Separación de Fl agregada y sin agre gar	63
2.7. INTERACCION DNA- HISTONAS	66
2.7.1. Curvas de precipitación	66
2.7.2. Disociación selectiva de cromatina - con ClNa	67
2.7.3. Formación de complejos DNA-Fl	68
2.7.4. Espectros de CD	69
2.7.5. Curvas de transición	70
2.8. METODOS ANALITICOS	71
2.8.1. Valoración cuantitativa de DNA	71
2.8.2. Valoración cuantitativa de proteínas	72
2.8.3. Electroforesis analítica de histonas en gel de poliacrilamida	73
2.8.4. Determinación de pesos moleculares .	78
2.8.5. Análisis de aminoácidos	80
2.8.6. Cromatografía de DNA en DEAE-celulo- sa	81

3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1. AISLAMIENTO DE HISTONAS TOTALES	85
3.1.1. Disociación salina	85
3.1.2. Extracción ácida	89
3.1.3. Discusión sobre los métodos de prepara - ción de histonas totales	93
3.2. IDENTIFICACION DE LAS BANDAS DE LAS IMAGENES ELECTROFORETICAS DE LAS PREPARACIONES DE HIS TONAS TOTALES	94
3.2.1. Extracción selectiva con ácidos	95
3.2.2. Fracción 5. Naturaleza y propiedades ...	97
3.2.3. Identificación de las bandas restantes .	103
3.3. PURIFICACION DE LA FRACCION F1 DE CERATITIS CAPITATA	106
3.4. PROPIEDADES DE LA FRACCION F1	109
3.4.1. Agregación de la fracción F1	109
3.4.2. Peso molecular de la fracción F1	112
3.4.3. Dependencia de la agregación con el tiem po	114
3.4.4. Separación de las especies moleculares de F1 agregada y sin agregar	116
3.5. ESTUDIO DE LA INTERACCION F1-DNA.	120
3.5.1. Influencia de la fuerza iónica del medio en la disociación DNA-histonas	120
3.5.2. Experimentos de precipitación del DNA por F1	122
3.5.3. Estudio sobre los complejos F1-DNA	129
4. <u>CONCLUSIONES</u>	151

5. BIBLIOGRAFIA

157

PARTE TEORICA

I.- P A R T E T E O R I C A

=====

1.1. INTRODUCCION

=====

1.1.1. DEFINICION, LOCALIZACION CELULAR Y DESARROLLO HISTORICO DEL ESTUDIO DE LAS HISTONAS

Si bien es admitido universalmente que la información genética se encuentra contenida en el DNA, en organismos eucarióticos este DNA está estructurado de una forma especial, complejo con otras especies moleculares, - para dar lugar a una estructura superior denominada cromatina. "Cromatina" es sin embargo una denominación ambigua, ya que no concreta de una forma total una determinada partícula subcelular. Sin embargo se ha de encontrar en su estructura y composición la justificación de todos los procesos de regulación genética. El conocimiento de su estructura ayudará sin duda a comprender mejor su función.

No ha de pensarse sin embargo en la estructura de la cromatina como algo estático (ya que su función -- tampoco lo es), y en cierto modo, el encontrar las condiciones y circunstancias de sus cambios estructurales es una buena aproximación al conocimiento de sus funciones.

Se hace necesario, pues, el conocimiento de -- dos características fundamentales del material genético de organismos eucarióticos: por una parte la composición molecular de ese material y por otra su estructura. Como una cuestión integradora de ambos conocimientos se ha de tratar de investigar las especies moleculares concretas responsables de esa estructura así como las condiciones del medio que la hacen posible, entendiendo por condiciones del medio los valores de pH, fuerza iónica, etc.

Los mecanismos de replicación y transcripción genética, claramente explicados para organismos procarióticos, se complican en los eucarióticos por un doble motivo. Por una parte debido a la existencia de una organización estructural, claramente diferenciada a nivel celular (la cromatina) y por otra a la aparición del fenómeno de la diferenciación celular en organismos superiores, lo que implica que toda la extensión del material -- genético de dichos organismos no se expresa en una célula somática diferenciada. Y la explicación habrá que -- buscarla en esta doble vertiente: composición y estructura. Ambos criterios han de ser convergentes, ya que serán respectivamente causa y efecto.

La cromatina se encuentra localizada durante la interfase del ciclo celular en el núcleo, claramente diferenciado. La proporción de las distintas especies moleculares que lo componen (proteínas no cromosomales, DNA, RNA, proteínas básicas y proteínas cromosomales ácidas) varía según la fase del ciclo celular. Sin embargo la relación DNA/proteínas básicas permanece prácticamente constante (Johns, 1971). Estas proteínas básicas han sido las más estudiadas hasta ahora desde los dos puntos de vista anteriormente mencionados (composición y estructura). La explicación de la atención puesta sobre estas proteínas se debe quizá a dos razones fundamentales: la facilidad de su aislamiento y su naturaleza básica, basicidad que sin duda será causa de asociaciones fuertes al DNA y como consecuencia inducirán modificaciones estructurales apreciables en el material genético.

Desde los descubrimientos iniciales de Miescher (1874) y Kossel (1884) de la existencia de sustancias básicas en el núcleo celular, hasta la separación cromatográfica en varias fracciones de este material por cambio de ión realizada en 1955 por Crampton y col. y los métodos descritos por Luck y col. (1956) existe un amplio intento de clasificación y clarificación de este material, denominado desde un principio "histonas". Fueron Stedman y Stedman (1950) los primeros en comprobar que este material no era una proteína homogénea, sino que estaba compuesto por toda una serie de fracciones distintas.

La situación sin embargo seguía siendo bastante confusa. Fue la aplicación de dos técnicas particulares lo que vino a clarificar la cuestión: Neelin y -- Connell (1959) separaron electroforéticamente en gel de poliacrilamida, y solo con fines analíticos, distintas fracciones de una preparación de histonas, pudiéndose -- desde entonces hacer comparaciones entre las distintas preparaciones obtenidas. Por otra parte Luck y col. -- (1956) y Phillips (1958) determinaron los residuos N-terminales de histonas. Estas dos técnicas, modificadas -- posteriormente, significaron el poder distinguir y comparar las distintas fracciones de histonas.

Antes de proseguir adelante se hace preciso -- una definición clara de las histonas. Para definir satisfactoriamente una proteína han de conocerse perfectamente sus características moleculares y su función celular. En el caso de las histonas, presentan serias dificultades tanto una como otra. Por una parte, aunque -- tengan características moleculares peculiares, no son -- lo suficientemente concretas, dada su heterogeneidad molecular y su variación en especies y órganos, como para poder constituir por sí solas una buena definición. Dentro de las características moleculares más peculiares -- Johns (1971) enumera alguna de ellas como un criterio, si no de definición sí de caracterización molecular:

1º.- Las histonas contienen más de un 22% de aminoácidos básicos.

2º.- Su carga neta puede ser positiva a pH 8 e incluso a valores superiores de pH. Por tanto, una histona puede contener mayor proporción de aminoácidos ácidos que básicos, siempre que estos aminoácidos se encuentran como amidas (glutamina y asparagina) en la proteína original.

3º.- Cuando una preparación de histonas contiene un alto nivel de cisteína ó cistina indica que existe -- contaminación por proteína no histona.

4º.- Los principales y más frecuentes residuos N-terminales libres son alanina y prolina. Gran parte de los aminoácidos N-terminales se encuentran acetilados.

5º.- Los principales residuos C-terminales son lisina, glicocola y alanina.

Hay que advertir sin embargo que estas propiedades no son completamente excluyentes. Las anteriores propiedades se han deducido a partir de histonas extraídas de una extensa variedad de especies y órganos. En cambio no es de extrañar que se puedan encontrar preparaciones en determinados materiales que se aparten virtualmente de estas características.

El otro criterio de definición anteriormente mencionado, la funcionalidad, no es de aplicación válida a las histonas, ya que su función celular no está claramente determinada. Un criterio de localización puede --

sin embargo sustituir en cierto modo el criterio de funcionalidad. Así, de todos los intentos de definición, parece ser la dada por Murray (1964), que contiene ambos criterios de características moleculares y localización celular, la más acertada: "las histonas son proteínas básicas que, en algún momento del ciclo celular, se encuentran asociadas al DNA". En esta definición está explícita la condición de presencia nuclear de estas proteínas, por lo que si se intenta su extracción sin previa purificación del material donde han de estar contenidas se verá afectada la preparación de posibles contaminantes extranucleares, como pueden ser proteínas básicas ribosomales, que por su parecida naturaleza molecular se extraen en semejantes condiciones que las histonas, pudiendo suponer este hecho problemas de identificación. Sin embargo, la conveniente estandarización del material empleado, el comportamiento conservativo a nivel evolutivo de determinadas fracciones en todas las especies observadas y los procedimientos de extracción selectiva pueden sustituir y hacer innecesario este proceso de purificación.

1.2. PREPARACION DE HISTONAS TOTALES

Como paso previo a cualquier preparación de -- histonas será pues necesario, a la vista de las conclusiones expuestas en el apartado anterior, la obtención -- de desoxirribonucleoproteína (DNP) en un estado relativamente puro. Normalmente, antes de proceder a la extracción de histonas totales a partir de esta DNP se efectúan

lavados con ClNa 0.35M con el fin de eliminar posibles -- proteínas no histonas, que aunque se encuentran asociadas al DNA, lo están más débilmente que las histonas y se disocian a fuerzas iónicas más bajas (Johns y Forrester, 1969).

Una vez obtenida DNP suficientemente pura existen fundamentalmente dos procedimientos para la extracción a partir de ella de histonas totales. El primero de ellos consiste en el tratamiento de la DNP con ácidos diluidos (ClH 0.25N ó SO_4H_2 0.25N) que precipitan ácidos nucleicos, proteínas ácidas y neutras, permaneciendo en cambio las histonas en disolución. La extracción ácida implica varias ventajas, tal como se tratará más exhaustivamente en "Material y Métodos". Entre otras, impide la actuación de las proteínas proteolíticas (Phillips y Johns, 1959) y desfavorece la agregación que suele producirse a valores de pH próximos a la neutralidad (Mauritzen y Stedman, 1967).

El segundo de los procedimientos consiste en la disociación de la DNP utilizando altas fuerzas iónicas (normalmente ClNa 2.0M). Tiene este procedimiento la -- ventaja fundamental de la previa separación del material insoluble en este medio. Posteriormente existen varios procedimientos para separar las histonas del DNA en la DNP disuelta y disociada: precipitación del DNA llevando la disolución a valores de pH ácidos (con ClH ó SO_4H_2), separación por ultracentrifugación (Bonner y Jahanson, 1966) y separación por cromatografía en geles, fundamenen

talmente Sepharosa 48 (Loeb, 1968). Frente a la mayor pureza de las histonas obtenidas por este procedimiento de disociación salina en relación con las preparadas por extracción ácida hay que considerar un gran inconveniente: la agregación de histonas que tiene lugar a valores de pH próximos a la neutralidad, y que es causa del bajo rendimiento con que se extraen algunas de las fracciones (Davinson y Shooter, 1956; Johns, 1968). En la Tabla 1 se muestran análisis de aminoácidos de preparaciones de histonas totales extraídas de distintos materiales biológicos por los dos procedimientos indicados. En ella se puede observar, sobre todo en algunos materiales, serias diferencias, como es una pronunciada variación en la relación B/A.

1.3. PREPARACION DE FRACCIONES DE HISTONAS

=====

Se han utilizado dos vías fundamentales para el aislamiento de las distintas fracciones de histonas. La primera de ellas consiste en fraccionar la preparación de histonas totales por distintos procedimientos, fundamentalmente técnicas cromatográficas y de precipitación. La utilización de cromatografía en Amberlita IRC-50, inicialmente utilizada por Luck y col. (1958) y perfeccionada posteriormente (Rasmussen y col., 1962; Murray, 1964) consiste resolver en cuatro fracciones las preparaciones de histonas. La cromatografía en CMC (carboximetil celulosa) separa en tres fracciones una preparación de histonas totales (Johns y col., 1961), que dieron nombre a la

clasificación más utilizada de histonas (F1, F2 y F3). Otros métodos utilizados, tal como la cromatografía en --geles (Sephadex G-75 por Cruft en 1969, y más reciente-- mente en Biogel P100 por Sommer y Chalkley en 1974), dis--tribución en contracorriente (Butler y col., 1967) y téc--nicas de precipitación que utilizan una gran variedad de reactivos, tales como acetona, etanol, TCA, etc., (Johns, 1971) consiguen la separación en una diversidad de frac--ciones pero que realmente son solo completamente efecti--vos para la separación de F1.

La extracción selectiva de cromatina con diver--sos agentes químicos se suele utilizar con frecuencia pa--ra el aislamiento de una determinada fracción. Este pro--cedimiento no hace necesaria en general la previa purifi--cación de la cromatina y se obtienen mayores rendimien--tos, hechos que significan una gran ventaja con respecto a los procedimientos anteriormente citados. En general, la utilización de distintos medios de extracción (inorgá--nicos, orgánicos ó mezcla de ambos) pretende neutralizar la diversa naturaleza de las interacciones de las dife--rentes fracciones de histonas con DNA, o bien la mayor o menor solubilidad en los distintos medios. Así, por ejem--plo, la utilización de distinta fuerza iónica separa se--lectivamente las fracciones de histonas (Hindley, 1964; Georgiev y col., 1966; Ohlenbusch y col., 1967) y lo mis--mo sucede con ácidos (Murray, 1966; Davison y Butler, --1954; Denooij y Wenstenbrink, 1962; Johns y Butler, 1962), combinando en estos casos el efecto del pH con el distin--to efecto precipitante por formación de sales insolubles.

En la Tabla 1-I se esquematizan algunos de estos procedimientos, y en la Figura 1.1 un método muy empleado de fraccionamiento de las distintas fracciones a partir -- del mismo material.

1.4. COMPLEJIDAD Y HETEROGENEIDAD DE LAS HISTONAS =====

1.4.1. CLASIFICACION Y CARACTERISTICAS GENERALES DE LAS DISTINTAS FRACCIONES

Tal como se ha visto en el apartado anterior las histonas están constituidas por distintas fracciones, que se pueden separar cromatográficamente en tres fundamentales grupos (F1, F2 y F3). alguna de estas -- fracciones cromatográficas están a su vez constituidas por más de una fracción, puestas de manifiesto por posteriores fraccionamientos y por electroforesis analítica en gel de poliacrilamida. Actualmente se suele aceptar la presencia de cinco fracciones de histona en la -- mayoría de los materiales observados (F1, F2A1, F2A2, -- F2B y F3). Además de su caracterización electroforética, que como habrá ocasión de discutir no varía o varía muy poco en alguna de ellas con respecto al material empleado, la clasificación atiende también en general a -- la proporción relativa de lisina y arginina (Lys/Arg) -- en su composición de aminoácidos. Así la fracción F1 -- es muy rica en lisina, la F2B moderadamente rica en li-

T A B L A 1-I

Algunos procedimientos de extracción selectiva de fracciones de histonas utilizando sales y mezclas de disolventes orgánicos e inorgánicos.

Medio de extracción	Fracción extraída	
ClNa 0.75 M	F1	(1)
PCA 5%(p/v)	F1	(2)
Etanol-ClH	F2A1, F2A2 y F3	(3)
Etanol-ClGu	F2A1, F2A2	(4)
Precipitación fracc cionada con acetona	F2A1	(5)

(1) Ohlenschlag y col., 1967

(2) Johns y Butler, 1962

(3) Johns, 1964

(4) Johns, 1967

(5) Perera, 1975

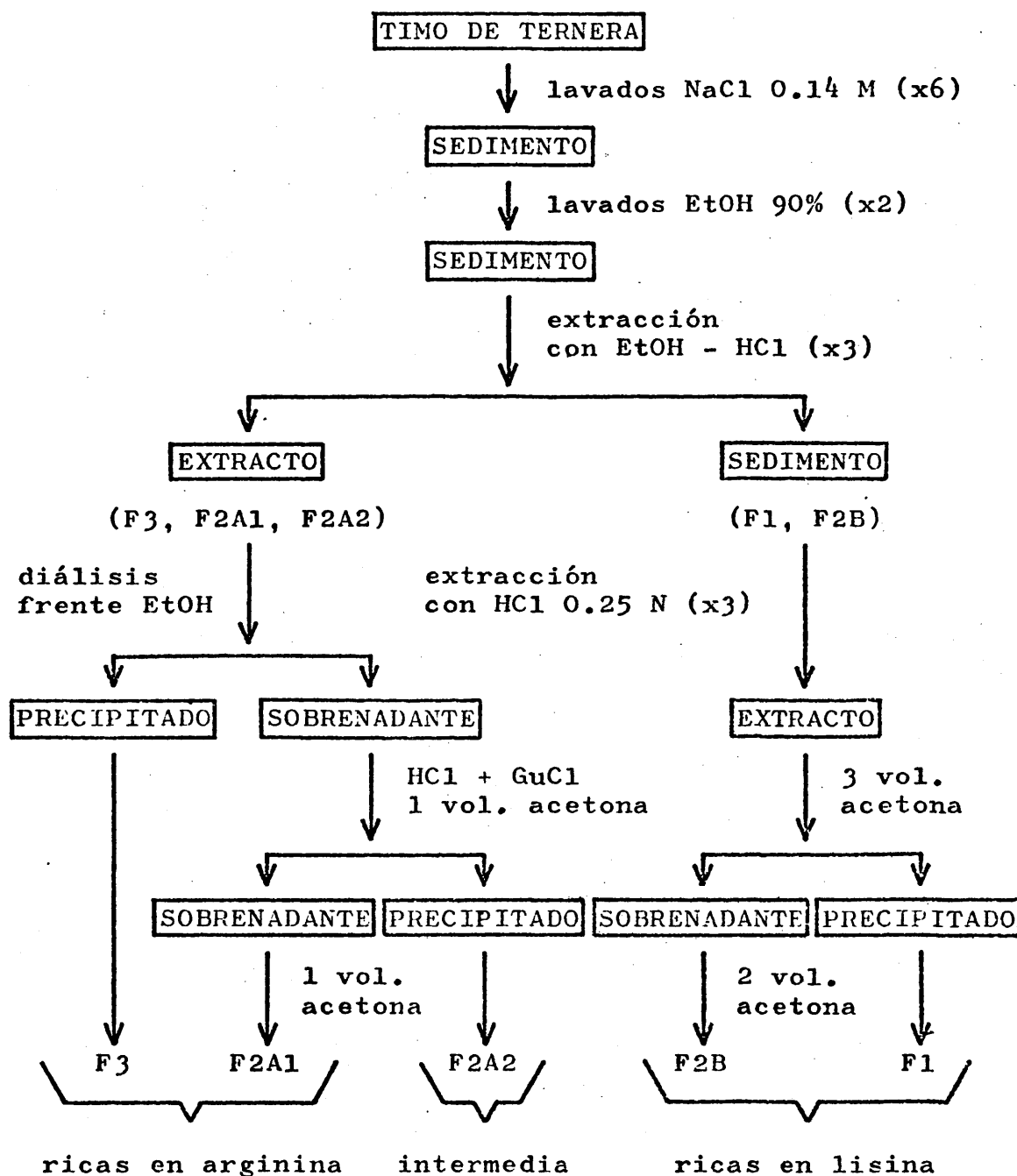


Figura 1.1.- Método para la preparación de las cinco fracciones principales de histonas de timo de ternera (Johns, 197

mina, F2A1 y F3 muy ricas en arginina y F2A2 intermedia. Pero además algunas de estas fracciones poseen peculiaridades propias, como se tendrá ocasión de discutir, aunque estas propiedades no siempre se conservan en todos los materiales observados. Sin embargo sí se puede decir que en general la presencia de las cinco reacciones fundamentales descritas es una constante. En la Tabla 1-II se muestran algunas de las características moleculares de estas fracciones. Además existen algunas fracciones características de determinadas células, como es la denominada F2C de eritrocitos nucleados (Hnilica, 1964; Neelin y col., 1964; Edwards y Hnilica, 1968) y eritroblastos de pollo (Sotirov y Johns, 1972). Asimismo se ha aislado una proteína soluble en ácido, de una movilidad electroforética similar a la F2C a partir de hígado (Nelson y Yunis, 1969) y de cristalino (Johnson y Rothstein, 1970) de rana, y una proteína básica específica de bajo peso molecular a partir de testículos de rata (Kistler y col., 1973). A la vista de la Tabla 1-II y teniendo en cuenta diversos hechos experimentales se pueden exponer algunas características generales de las distintas fracciones:

1º.- La histona muy rica en lisina F1 se distingue de las demás fracciones fundamentalmente por su alto contenido en lisina, alanina y prolina, y en la ausencia de histidina. Es la única fracción soluble en PCA al 5% (Johns y Butler, 1962) y en TCA a concentraciones superiores al 10% (Denooij y Wenstenbrick, 1962). No precipita al DNA en C1Na 0.5M mientras que las otras fracciones sí lo hacen (Johns, 1971).

T A B L A 1-II

Composición de aminoácidos y datos derivados de la
co fracciones principales de histonas de timo de ternera.

Aminoácido	Moles por cien moles				
	F1	F2B	F2A2	F2A1	F3
Acido aspártico	2.5	5.0	6.6	5.2	4.2
Treonina	5.6	6.4	3.9	6.3	6.8
Serina	5.6	10.4	3.4	2.2	3.6
Acido glutámico	3.7	8.7	9.8	6.9	11.5
Prolina	9.2	4.9	4.1	1.5	4.6
Glicocola	7.2	5.9	10.8	14.9	5.4
Alanina	24.3	10.8	12.9	7.7	13.3
Valina	5.4	7.5	6.3	8.2	4.4
1/2 Cisteina	0.0	tr	tr	tr	1.0
Metionina	0.0	1.5	tr	1.0	1.1
Isoleucina	1.5	5.1	3.9	5.7	5.3
Leucina	4.5	4.9	12.4	8.2	9.1
Tirosina	0.9	1.6	0.9	2.1	3.1
Lisina	26.8	14.1	10.2	10.2	9.0
N-metillisina	0.0	0.0	0.0	1.2	1.0
Histidina	tr	2.3	3.1	2.2	1.7
Arginina	1.8	6.9	9.4	12.8	13.0
B/A	4.6	1.7	1.4	2.2	1.6
Lys/Arg	15.0	2.0	1.1	0.9	0.8
N-terminal	acetil	prolina	acetil	acetil	alani
C-terminal	lisina	lisina	lisina	glicocola	alani

Johns, 1971

2º.- La histona moderadamente rica en lisina F2B - tiene un alto contenido en serina y es la única cuyo aminoácido N-terminal es prolina.

3º.- La fracción intermedia F2A2 tiene un alto contenido en leucina como característica diferenciadora.

4º.- La fracción rica en arginina F2A1 tiene un alto contenido en glicocola y también es este aminoácido - el C-terminal. Agrega a muy bajas concentraciones de -- TCA (0.01N) (Johns, 1968b).

5º.- La fracción rica en arginina F3 parece ser la única que contiene cisteína y tiene como grupos N y C-terminales alanina. Debido precisamente a la presencia de cisteína en su molécula forma con facilidad polímeros en condiciones ligeramente oxidantes. Concretamente a pH 7 forma agregados de distinto grado de polimerización que dan lugar a diversas bandas de baja movilidad en electroforesis.

Hay que tener en cuenta sin embargo que las anteriores propiedades son criterios que no hay que generalizar demasiado, siendo quizá el contenido relativo de - aminoácidos básicos el de mayor importancia. De todas - formas, una desviación excesiva de las anteriores propiedades pueden dar lugar a fundamentadas sospechas sobre - la presencia de algún componente contaminante en gran cantidad.

La localización electroforética de las distintas fracciones suele ser un primer criterio indicativo de identificación. Por ejemplo, una proteína que fuera muy rica en lisina y de baja movilidad electroforética sería lógico catalogarla, en primera instancia y sin perjuicio de posteriores comprobaciones, como F1.

La simplicidad aparente de la poca heterogeneidad molecular de las histonas no es en cambio la absoluta realidad. Si bien es cierta la constancia de las cinco fracciones fundamentales en todas las células somáticas observadas, tal como se ha indicado, también sucede que alguna de estas fracciones presenta una variada homogeneidad molecular, puesta de manifiesto fundamentalmente por técnicas electroforéticas o cromatográficas con diversas modificaciones que consiguen mejor resolución.

Parece ser un hecho comprobado que de todas las fracciones descritas es la F1 la que mayor microheterogeneidad presenta. Así, en electroforesis en gel de poliacrilamida de alta resolución se llegan a separar hasta cuatro subfracciones distintas de F1 de timo de ternera (Buckingham y Stoken, 1970), con una composición muy similar de aminoácidos lo que hace suponer pequeñas variaciones en su estructura primaria. Sin embargo presentan notables diferencias las cuatro subfracciones así obtenidas cuando se estudia su transformación covalente mediante una acción enzimática. Así, se observan grandes diferencias en la fosforilación enzimática "in vitro" de las distintas subfracciones. Parece ser que algunas subfracciones poseen a su vez microheterogeneidad.

También se consiguen separar subfracciones por cromatografía en cambio de ión (Amberlita IRC-50), utilizando como eluyente un gradiente de cloruro de guanidinio, obteniéndose hasta tres distintas bandas en timo de ternera (Bustin y Cole, 1968), la tercera de las cuales - está compuesta a su vez de al menos dos. Parece ser que existen también aquí pequeñas variaciones en su estructura primaria, ya que al realizar una digestión triptica - de las distintas subfracciones individuales, los mapas - tripticos correspondientes son muy similares. Se ha sugerido que en las distintas subfracciones de F1 existe - una región invariante común a todas ellas (Kinkade y col., 1966). Una prueba de las diferencias estructurales de - las distintas subfracciones es la diferente respuesta inmunológica de cada una de ellas (Bustin y Stoller, 1972; Hekman y Sluyser, 1973).

La microheterogeneidad de la fracción F1 parece, pues, clara, pero no sucede lo mismo con las otras - fracciones. Así, existían dudas sobre la posible hetero- geneidad de la fracción F2B (que aparentemente se resol- vía en varias subfracciones en sulfoetilcelulosa, (Hnilica, 1967); carboximetil celulosa a pH 9 (Johns, 1968, b) y por distribución en contracorriente (Butler, 1967)), - pero la gran posibilidad de autoagregación de esta frac- ción, así como la agregación a otras fracciones permitió desechar la interpretación inicial de estos resultados. Las fracciones ricas en arginina (F2A1, F2A2 y F3) pare- cen ser proteínas homogéneas (Delange y col., 1968). Se puede pensar, según se discutirá en secciones postero-

res, que esta heterogeneidad puede tener una clara interrelación con la función específica de las distintas fracciones.

1.4.2. VARIACION DE LAS DISTINTAS FRACCIONES EN ESPECIES Y ÓRGANOS

La presencia de las cinco fracciones fundamentales descritas en el apartado anterior es un hecho demostrado en todas las células somáticas investigadas hasta la fecha. Sin embargo, como también se indicó, existen fracciones específicas en determinadas células muy especializadas. Por ejemplo, la presencia de fracción F2C en eritrocitos de aves, donde está muy limitada la acción del DNA. En organismos unicelulares, en cambio, la situación es distinta. En bacterias, aunque existe la posibilidad de presencia de proteínas semejantes a histonas (Leaver y Cruft, 1966; Raaf y Bonner, 1968) no se encuentran sin embargo en las proporciones relativas a la cantidad de DNA encontrado en las células de organismos superiores. De la misma forma se encuentran ausentes en una especie de algas azul verdosas investigada (Makino y Tsuzuki, 1971). Esta es, pues, la situación en organismos procarióticos: la casi total o completa ausencia de histonas en estos materiales. El hecho de que no exista una cromatina diferenciada y la forma especial en que se encuentra el material genético en estos organismos puede ser una consecuencia de la falta de estas proteínas. Al mismo tiempo, la poca complejidad con res

pecto a los organismos eucarióticos hace explicable esta ausencia.

En cambio, a partir de organismos eucarióticos unicelulares (por tanto no diferenciados) se pueden obtener histonas. Se ha conseguido separar histonas de algas (Twai, 1964), protozoos (Iwai y col., 1965; Iwai y col., 1970; Pieri y col., 1968) y levadura (Tonino y Rozijn, 1966; Winstersberger y col., 1973; Franco y col., 1974).

Sin embargo en muchos de estos organismos no se encuentran todas las fracciones de histonas. Así, Franco y col. (1974) describieron la ausencia de F1 y posiblemente de F3 en levadura de pan y Rizzo y Nooden (1972) detectaron en dos especies de algas dinoflageladas solo el 10% de la proteína soluble en ácido existente en organismos eucarióticos superiores, apareciendo más del 80% con igual movilidad que la fracción F2A1. Tampoco se han detectado proteínas solubles en ácidos en la cromatina de varias especies de hongos (Leighton y col., 1971; Dwiredi y col., 1969). De Neurospora crassa se pueden extraer dos proteínas básicas que se asemejan a histonas moderadamente ricas en lisina y que representan aproximadamente la cuarta parte de la cantidad total de histonas encontrada en organismos superiores (Hsiang y Cole, 1973). En otros organismos unicelulares en cambio (tal como ocurre en Physarium policephalum) se encuentran las cinco fracciones en idénticas proporciones que las encontradas en organismos superiores (Mohberg y Rusch, 1970).

En estos organismos, aunque no diferenciados, es evidente que existe mayor complejidad estructural y funcional que en los organismos procarióticos.

Algunas fracciones presentan una gran constancia a lo largo de toda la escala evolutiva. Así la fracción F2A1 parece ser la más conservativa de todas ellas, constancia demostrada por movilidad electroforética, composición de aminoácidos y secuencia (Delange y col, 1968; Delange y col., 1969; Panyim y col., 1979). Sin embargo se han encontrado pequeñas variaciones en la composición de aminoácidos de la fracción F2A1 de algunas especies, como la anormal presencia de cisteína en F2A1 de equinodermos (Subirana, 1971).

La fracción F3 también presenta pocos cambios en los materiales observados, mientras que las fracciones F2A2 y F2B varían ligeramente en movilidad electroforética, manteniendo idéntico peso molecular, lo que parece indicar cambios en su densidad de carga.

La fracción F1 es la que más variaciones presenta. No solamente se observan diferentes movilidades electroforéticas entre las F1 preparadas de distintas especies, sino que además se encuentran variaciones en la microheterogeneidad de esta fracción entre distintos órganos de la misma especie (Bustin y Cole, 1968; Hohmann y col., 1971). Así se observan variaciones en la composición de aminoácidos de la fracción F1 extraída de timo y glándulas mamarias de ratón, si bien parece que el estado fisiológico no influye (Stellwagen y Cole, 1968).

La distinta movilidad electroforética de la --
fracción F1 aislada de distintas especies es un reflejo
de la diferente carga neta positiva total y pesos molecu-
lares, tal como se observa en electroforesis en presen-
cia de SDS (Panyim y col., 1971).

La fracción F1 aislada de insectos presenta se-
rias divergencias con respecto a su homóloga de otras es-
pecies. El primer hecho llamativo es su menor movilidad
electroforética, lo que al principio hizo que no se atri-
buyera esta banda a la fracción F1, sino que se interpre-
tara como una consecuencia del estado de agregación de -
otras fracciones (Dick y Johns, 1969a). La razón lógica
de su baja movilidad hay que buscarla sobre todo en la -
menor proporción de aminoácidos básicos, demostrada por
su análisis de aminoácidos, lo que da lugar a una menor
densidad de carga (Oliver y Chalckley, 1972), aunque tam-
bién posee mayor peso molecular. Sin embargo, tal como
ponen de relieve los mismos autores, no se resuelve es-
ta fracción en electroforesis de alta resolución, lo --
cual hace sospechar su menor microheterogeneidad en in--
sectos.

Las diferencias de la F1 de insectos con res--
pecto a la de mamíferos se refleja también en su distin-
ta y peculiar composición de aminoácidos. Si bien es ver-
dad que la proporción de lisina y arginina en F1 de Dro-
sophila melanogaster es prácticamente igual que en F1 de
hígado de rata, en cambio varían considerablemente todos
los demás aminoácidos (Rodríguez y col., 1974). Contiene

much menor proporción de prolina, glicocola y lanina, y en cambio están aumentadas considerablemente las proporciones de residuos hidrofóbicos e hidrofílicos. Particularmente llamativa es la presencia en la F1 de Drosophila melanogaster de metionina, histidina y cisteína. Concretamente la presencia de cisteína es una particularidad importante, dado que este residuo solo ha sido detectado en la fracción F3 y en F2A1 de equinodermos.

La existencia de un residuo de metionina en la molécula de F1 de Drosophila melanogaster hace posible su ruptura específica en dos péptidos. Tal como se ha observado en otros materiales y se ha discutido anteriormente, la parte C-terminal de la molécula parece bastante conservativa y contiene la mayoría de los residuos básicos, pudiendo ser esta parte la directamente implicada en la interacción con la molécula de DNA. En cambio se observan grandes diferencias en la parte N-terminal con respecto a mamíferos (Alfageme y col., 1974). Estos autores llegan incluso a proponer la posibilidad de que esta gran diferencia ha de ser responsable de acentuados cambios estructurales en la fracción F1 de insectos que condiciona de particular forma el "entrecruzamiento" de moléculas de DNA, pudiendo ser causa de la formación de los cromosomas politécnicos en estas especies. Sin embargo Fasman y col. (1971) encontraron que la parte C-terminal de la molécula de F1 es la que causa más profundos cambios conformacionales en el DNA actuando la parte N-terminal como inhibidor de este cambio conformacional, siendo además específico en cada caso concreto.

1.5. INTERACCIONES HISTONAS-DNA

=====

Al enfrentarse con el problema de las interacciones que tienen lugar entre el DNA y las histonas son dos las cuestiones fundamentales que se presentan. Por una parte el llegar a saber la naturaleza de la interacción, que lleva implícito el conocimiento de la energía libre de la asociación, y por otro, las modificaciones estructurales que tal asociación induce en el DNA.

Pero al tratar de resolver el primer problema existen varios hechos contradictorios. Es evidente que las histonas interaccionan con el DNA. La existencia de nucleoproteínas estables a fuerzas iónicas no muy altas implica la existencia de interacciones electrostáticas entre ambas especies moleculares. Por otra parte las histonas precipitan el DNA en disolución, por lo que también es una evidencia de la interacción (Johns y Forrester, 1970). La forma de cuantificar este fenómeno es llegar a encontrar la relación histona/DNA a la cual se produce la precipitación. El primer hecho relevante que aparece es la distinta capacidad precipitante de las diferentes fracciones (Johns y Forrester, 1970). Así es la fracción F1 la que a menores concentraciones precipita el DNA. Pero por otra parte en las pruebas de disociación salina, en las cuales se va aumentando progresivamente la fuerza iónica del medio y estudiando la separación selectiva de las distintas fracciones, es la fracción F1 la que antes se separa (Johns y Forrester, 1969).

Estos dos hechos parecen contradictorios: por una parte la fracción F1 es la más debilmente unida al DNA y por otra es la fracción que con mayor facilidad interacciona con el DNA formando agregados de alto peso molecular. Esta contradicción puede tener la respuesta en la intervención de un factor estructural que condiciona no tanto la energía de interacción como el modo en el cual dicha interacción se produce.

Si bien parece evidente la existencia de interacciones hidrofóbicas en la asociación histona DNA, puestas de manifiesto por la acción de distintos disolventes sobre la estabilidad térmica de los complejos (Olins, -- 1969), así como la distinta acción de disolventes apolares en la separación selectiva de fracciones, hay abundantes razones para pensar que la mayor contribución -- energética en la asociación se debe a interacciones electrostáticas, ya que los residuos básicos de la fracción F1 están neutralizados en un 80% cuando se encuentra asociada al DNA (Murray, 1969) y es probable que la precipitación del DNA por histonas se produzca debido a la formación de puentes salinos, ya que al disminuir excesivamente la fuerza iónica del medio decrece la precipitación (Sluyser y Snellen-Jurgens, 1970). Por otra parte la -- fracción F1 es la que menor carga neta posee de todas -- las fracciones, siendo por tanto lógico que sea la que -- antes se separa cuando se aumenta progresivamente la fuerza iónica del medio, sobre el supuesto de que sean interacciones iónicas las que establezcan la asociación (Johns, 1).

Por tanto, las razones de la mayor o menor preciptación del DNA por las distintas fracciones de histonas habrá que buscarlas más en la forma en la cual se -- realiza la asociación que en la naturaleza de las frac-- ciones que la producen.

Basándose en los anteriores hechos, así como -- en el efecto que produce la adición de pequeños péptidos al medio de precipitación, Sluyser y Snellen-Jurgens -- (1970) concibieron un modelo en el cual se justifican -- los hechos experimentales. Lo que en realidad justifica la mayor o menor capacidad de precipitación de las dis-- tintas fracciones es su facultad de "entrecruzar" distintas moléculas de DNA. Por tanto, tan importante como la carga neta positiva de las distintas fracciones va a ser la particular conformación de la proteína. Y la varia-- ción de la fuerza iónica es posible que no sólo tenga un papel neutralizante de interacciones electrostáticas, au^{men}utando la constante dieléctrica del medio, sino también modificando la conformación de la proteína, y por ende -- su capacidad de entrecruzar distintas moléculas de DNA. La conformación más o menos extendida de la molécula ha de favorecer o restringir, respectivamente, el entrecru-- zamiento.

Existen numerosos datos acerca de la estructu-- ra secundaria de las distintas fracciones de histonas en disolución. Las técnicas sin duda más empleadas, que -- permiten el cálculo del tanto por ciento de α -hélice exis^{ten} en disolución son el Dicroísmo Circular (D.C.) y --

la dispersión Rotatoria Optica (D.R.O.). Los estudios --
iniciales se deben a Elliot y col. (1962) quienes observa
ron el comportamiento de histona total en agua y urea 8M,
donde la proteína permanecía completamente en cadena esta
dística, y en dicloroetanol, en cuyo medio adopta una es
tructura parcialmente helicoidal.

Posteriormente se han estudiado por estas técni
cas detalles estructurales de cada fracción particular, --
relacionando las transiciones conformacionales con distin
tas variables, tales como el pH, fuerza iónica del medio,
distintos aniones, etc. (Bradbury y col., 1965, 1967; Jir
gensons y Hnilica, 1965; Fasman y col., 1970, 1971; Wickett
y col., 1972; Boublik, 1970 a y b; D'Anna e Isenberg, --
1974). Parece ser que todas las fracciones tienden a for
mar α -hélice cuando se modifican convenientemente las con
diciones del medio excepto la fracción F1 que permanece --
en cadena estadística. Por otra parte estudios de infra
rojo han demostrado la existencia de estructura --exten
dida en esta fracción. Este comportamiento estructural --
está completamente de acuerdo con la composición de ami--
noácidos de cada fracción, y la participación de los dis
tintos residuos en las estructuras α -helicoidales se pu--
sieron de manifiesto utilizando técnicas de Resonancia --
Magnética Nuclear (Boublik y col., 1970 a y b). Así, en
la región central de la fracción F1 comprendida entre los
aminoácidos 50 y 106 tiende a formar estructuras ordena--
das al aumentar la fuerza iónica del medio, mientras que
el resto de la molécula permanece en cadena estadística --
(Bradbury y Rattle, 1972). La parte inferior de la molé--

ula, tendente a formar estructuras ordenadas, fundamentalmente estructuras en la fracción F1, puede intervenir en fenómenos de interacción intercadena, asociándose con otras moléculas homólogas, y los extremos, con gran proporción de residuos básicos y que no forman estructuras ordenadas, sino que permanecen en cadena estadística, podrían estar implicadas en la interacción con moléculas de DNA.

Por tanto, y como conclusión de todo lo anteriormente expuesto, parece ser que en las particulares características de interacción DNA-histonas tiene un papel decisivo la conformación que adopta cada fracción.

1.6. ESTRUCTURA DE LAS NUCLEOHISTONAS

=====

Como consecuencia de la interacción histonas-DNA es de esperar que ocurran alteraciones estructurales tanto en el ácido nucleico como en la proteína. Estas modificaciones en la proteína pueden ser debidas al particular efecto iónico que la neutralización de sus cargas positivas puede realizar el DNA, que actuará como un polianión. En cuando al DNA, debido a su gran tamaño molecular y su posible flexibilidad mecánica puede alterarse su estructura como consecuencia de las restricciones estéricas a que está sometido como consecuencia de la interacción.

Por difracción de rayos X se pueden obtener detalles estructurales de los complejos DNA-histonas. Tiene el inconveniente esta técnica de utilizar fibras de nucleohistonas y a "priori" no se puede decidir si tendrá el mismo comportamiento estructural que en disolución. Se observó que en las fibras de nucleohistonas aparecían una serie de anillos a 11.0, 5.5, 3.7, 2.7 y 2.2 nm. Para explicar el origen de estas reflexiones, Wilkins (1964) propuso un modelo de cromatina según el cual el DNA, como consecuencia de su interacción con las histonas, adoptaría una configuración superhelicoidal. Durante una década se admitió, con algunas precisiones, (Richards y Pardon, 1970), este modelo, que fundamentalmente implicaba que el único motivo repetitivo a lo largo de las fibras de cromatina era el paso de la superhélice, que daría origen a todas las reflexiones, y que la intensidad de los anillos de difracción dependería primariamente del DNA (Pardon y Wilkins, 1972).

Pero hace dos años las ideas sobre la estructura de la cromatina comenzaron a cambiar como consecuencia de varios hallazgos experimentales. Hewish y Burgoyne (1973) encontraron que después de digerir la cromatina con endonucleasa, el DNA residual estaba constituido por una serie regular de fragmentos, cuyos tamaños eran múltiplos enteros del fragmento más pequeño. Poco más tarde se pudo comprobar que los fragmentos menores, cuya proporción aumentaba con el tiempo de incubación, contenían cerca de 200 pares de bases (Burgoyne y col., 1974). Sahasrabudde y Van Holde (1974), por otra parte, demostraron que los fragmentos de 200 pares de bases forman unas estructuras

-partículas PS- compactas y aproximadamente esféricas como se desprende su comportamiento hidrodinámico. La estructura compacta se destruye por tratamiento con tripsina, lo que demuestra que está mantenida por las histonas. Olins y Olins (1974) pudieron visualizar en la cromatina nativa, mediante microscopía electrónica, unas partículas semejantes, a las que denominaron cuerpos ν y todos estos resultados movieron a Van Holde a postular un modelo periódico para la estructura de la cromatina, en el que la periodicidad derivaba de la disposición regular de los cuerpos (Van Holde y col., 1974). Por otra parte, Kornberg (1974) postulaba en la misma fecha que la distribución de las histonas a lo largo de la fibra de cromatina tenía como unidad repetitiva un octámero formado por un tetrámero $(F2B - F2A2)_2$ y otro $(F3 - F2A1)_2$.

La reconciliación entre los modelos de organización periódica y la existencia de superhélice ha sido posible recientemente gracias a los trabajos del grupo de Bradbury sobre difracción de neutrones por la cromatina. Gracias a que los átomos de hidrógeno dispersan los neutrones de un modo anómalo, es posible distinguir las reflexiones debidas al DNA de las originadas por las proteínas. Así se ha podido concluir que el espaciado de 11 nm proviene de la proteína y corresponde a la separación entre cuerpos ν , mientras que las reflexiones de 5.5 y 2.7 nm están originadas por el DNA y responden a la existencia de 1.5-2 vueltas de una superhélice de DNA de 5.5 nm de paso por cada cuerpo ν (Baldwin y col., 1975). Según este modelo, el DNA sería exterior al núcleo central octa

trófico de histonas, lo que está de acuerdo con algunos resultados experimentales (Noll, 1974) y predicciones teóricas (Crick y Klug, 1975).

Pero los datos obtenidos mediante difracción de rayos X han de coincidir con los resultados estadísticos obtenidos por otras técnicas tales como el D.C. Al realizar el espectro de DN de nucleohistonas se obtienen varias bandas de absorción ópticamente activas. El espectro se puede dividir en dos regiones, anterior y posterior a 250 nm respectivamente. En la región comprendida entre 250 - nm y 320 nm se obtienen las bandas correspondientes al -- DNA de la nucleohistona, siendo tres las fundamentales. Hacia los 300 nm aparece una débil banda negativa, similar en localización a la que aparece en DNA nativo (Sarker y col., 1967) aunque de mayor magnitud de elipticidad. La banda de elipticidad positiva que aparece a 270 nm en el DNA se desdobra en dos bandas en la nucleohistona, a - 280 y 272 nm respectivamente. A menores longitudes de on da aparece una banda a 245 nm, también identificada como correspondiente al DNA libre en disolución (Brahms y Mommaerts, 1964; Sarker y col., 1967; Mommaerts, 1968). También presenta el espectro dos bandas bien definidas, de - elipticidad negativa, a 207 y 223 nm, propias de un espectro de proteína con una alta proporción de estructura α -hélicoidal (aproximadamente el 35-40% de α -hélice). Quizá el hecho más relevante del espectro es la reducción considerable de elipticidad a 280 nm en el complejo, que representa solo el 70% con respecto al DNA libre en disolución. Este resultado se puede interpretar si se considera que el

El DNA complejado con histonas forma una estructura superhelical. Entonces la disminución de elipticidad puede deberse a la parcial distorsión de las bases, que dejan de estar completamente paralelas tal como sucede en el DNA libre, como consecuencia de la formación de dicha superestructura en el complejo (Bonner y Tuan, 1968).

Sin embargo es interesante ver el papel de las distintas fracciones de histonas en la modificación estructural del DNA como consecuencia de la formación de los complejos. Los experimentos de difracción de rayos X se realizaron tanto a partir de nucleohistona nativa, a la cual se le iba extrayendo selectivamente las distintas fracciones de histonas, como a partir de complejos de nucleohistonas reconstituídas, a partir de DNA y de las distintas fracciones de histonas. En ambos casos era evidente la incapacidad de la fracción F1 de formar esta estructura frente a la semejante capacidad de las restantes fracciones (Richards y Pardon, 1970; Garret, 1971; Bradbury y col. 1972). Estos datos son totalmente concordantes con los resultados obtenidos por técnicas de D.C., estudiando la variación de elipticidad a 280 nm frente a la fuerza iónica del medio. Así se observó que la fracción F1 no alteraba prácticamente la estructura secundaria del DNA (Simpson y Sober, 1970). Estudios semejantes llevados a cabo con cromosomas dieron los mismos resultados (Matsuyama y col., 1971; Wagnery Spelberg, 1971; Shih y Lake, 1972) lo que además constituyó una prueba de que tanto la cromatina como los cromosomas están constituidos por la misma estructura secundaria elemental y lo único que varía es el estado de agregación molecular.

Parece ser, pues, que todas las fracciones de histonas, exceptuando la fracción F1, están en mayor o menor grado implicadas en la formación de superhélice, hecho favorecido sin duda por la particular estructura secundaria de estas fracciones que al poseer gran proporción de α -hélice favorecen las interacciones apropiadas para la formación de esta estructura, puesto de manifiesto sobre modelos atómicos donde el único factor determinante es la estereoespecificidad.

La superhélice ha de tener sin duda transcendencia funcional. Johns (1969) opina que la superhélice impide la actuación de la RNA polimerasa. Por otra parte la fracción F1, incapaz de formar superhélice, es la fracción que menos inhibe la transcripción de DNA (Alfrey y col., 1963; Hindley, 1963). Para la F1 estaría, pues, reservado el papel de "entrecruzar" distintas moléculas de DNA, y por tanto capaz de alterar únicamente las propiedades físicas a nivel "macroscópico" del material genético (por ejemplo, paso de cromatina densa a cromatina difusa). La capacidad de la fracción F1 de entrecruzar moléculas de DNA hoy día ya no es meramente una hipótesis que justifica determinados hechos experimentales (contradicción entre pruebas de precipitación y disociación) sino también un hecho comprobado por experimentos de ultracentrifugación y viscosimetría que añaden mayores evidencias a la anterior hipótesis (Lindigkeit y col., 1974; Smart y Bonner 1971; Littau y col., 1965 b; Fasman y col., 1970).

La modificación estructural del DNA como consecuencia de su interacción con histonas tiene también con-

las curvas en otras propiedades físicas, tal como el aspecto de las curvas de transición térmica. La aparición de una polifasicidad en dichas curvas demuestra la existencia de zonas cualitativamente distintas en los complejos DNA-histonas. Concretamente, en los complejos DNA-F1 aparecen dos puntos de inflexión, uno de ellos correspondiente a una temperatura de transición del orden de magnitud al correspondiente al DNA libre, aunque si bien se modifica por la distinta relación DNA-F1 de los complejos, y otro que permanece constante y que tiene un valor muy superior (Olins y Olins, 1971). Este hecho hace pensar que existen dos regiones claramente distintas en el DNA en su asociación a la proteína. Existiría una zona de íntima unión, que conduciría a una estructura claramente distinta, con muy superior energía libre en la asociación y con una T_M característica, y otra parte a la cual no se une la fracción F1, cuyo valor de T_M es idéntico al DNA libre, y que sin embargo se puede ver modificado por la distinta proporción de asociada, posiblemente porque ésta actúa como polielectrolito estabilizando la doble hélice de la misma forma que lo hace la fuerza iónica del medio. La posibilidad de fragmentar el complejo con ultrasonidos y separar los distintos fragmentos por cromatografía puede proporcionar evidencias de las distintas partes del DNA donde la fracción F1 se une (Ansevin y col., 1971). La constancia en proporción de bases en estos fragmentos así separados hace pensar en una posible especificidad en la interacción. Aunque existen otras evidencias en esta posible especificidad (Sponar y col., 1972; Wahling y col., 1975) no son lo suficiente--

ante explícitas como para poder deducir de forma clara --
que existan reconocimientos biunívocos entre ambas es-
pecies moleculares. De todas formas las curvas de transi-
ción aportan una valiosa información sobre los complejos.
Sus formas características proporcionan información de --
las relaciones entre el incremento de entalpía y el incre-
mento de entropía en las transiciones conformacionales,
así como de los fenómenos cooperativos que tienen lugar --
en la transformación.

1.7. DIRECCION DE LA INVESTIGACION REALIZADA

=====

Aunque, como ha quedado expuesto en los aparta-
dos precedentes, el conocimiento actual de las histonas --
abarca desde los mamíferos hasta los organismos unicelula-
res, la mayor parte de las investigaciones realizadas se
han efectuado con organismos superiores. Es particular--
mente llamativa la escasez de información sobre histonas
de insectos, a pesar del interés que ello tiene, tanto --
por su situación intermedia en la escala evolutiva, como
por los cambios definidos que experimentan durante su me-
tamorfosis y diferenciación.

Salvo algún estudio realizado con Oncopeltus dos-
ciatus (Harris y Forrest, 1970) y con Acheta domestica --
(Pallotta y Berlowitz, 1970), las investigaciones sobre --
histonas de insectos se han llevado a cabo con Drosophila
melanogaster (Cohen y Gotchel, 1971; Oliver y Chal

Kicy, 1972; Alfageme y col., 1974). En ellas se ha puesto de manifiesto que, con la excepción de la fracción muy rica en lisina, Fl, las demás histonas son muy semejantes a las de organismos superiores. Este hecho es perfectamente típico si se tienen en cuenta las características de conservatividad anteriormente aludidas.

El propósito del presente trabajo es la aportación de nuevos datos sobre la naturaleza de las histonas de insectos, con el fin de completar esa escasez de conocimiento varias veces referida. Como material biológico se ha elegido el díptero Ceratitis capitata cuyo ciclo vital y bioquímica del desarrollo se conoce suficientemente como consecuencia de investigaciones realizadas previamente en este Departamento (Fernández-Sousa y col., 1971; Múñico y col., 1971, 1972).

El objetivo de esta Memoria se centra más particularmente en el estudio de la histona Fl, que, como se discutirá más adelante, es la que presenta rasgos más peculiares, de acuerdo con las ideas comentadas. En este sentido, se aportan datos que constituyen una contribución al conocimiento de la función e historia evolutiva de la histona de papel más singular en la estructura del material genético de eucariontes. Como etapa previa a este estudio, ha sido necesaria, evidentemente, la caracterización de las histonas del insecto y la puesta a punto de métodos de aislamiento y purificación.

M A T E R I A L . Y . M E T O D O S

II.- MATERIAL Y METODOS

2.1. PREPARACION DEL MATERIAL BIOLOGICO

=====

Se utilizó el material cedido por el Instituto de Investigaciones Agronómicas (díptero Ceratitis capitata), cultivado según el procedimiento descrito por Municio y col. (1970).

Los insectos, recogidos en su estado de adulto farato, se conservaron en -15°C hasta su utilización.

2.2. PREPARACION DE CROMATINA

=====

La preparación de cromatina cruda (no purificada), fue paso previo a cualquier preparación de histonas. No se consideró necesario en la mayoría de los casos su purificación ya que se obtenían a partir de ella histonas con suficiente grado de pureza lo que simplificaba mucho la metodología.

Para su preparación se utilizó el método descrito por Dick y Johns (1969) ligeramente modificado. Se homogeneizó el material de partida (díptero Ceratitis capitata, en su estado de adulto farato) convenientemente lavado para eliminar los restos de dieta que pudieran quedar adheridos a él, en aproximadamente cinco volúmenes -- (peso/volumen) de una disolución de ClNa 0.14M - Citrato trisódico 0.01M en "Omni Mixer" Sorvall durante cinco minutos a 220 V. A continuación se filtró a través de cuatro capas de gasa y el filtrado se centrifugó a 1.500 g durante 30 minutos en rotor angular GSA de la centrífuga Sorvall RC-28. El sedimento resultante, convenientemente suspendido, se lavó en dos volúmenes de ClNa 0.14M - Tris 0.01M, pH 7.5, centrifugándose en las mismas condiciones, pero solamente durante 15 minutos. El lavado se repitió hasta que el sobrenadante quedó completamente claro (con cuatro o cinco lavados era suficiente). El sedimento final, llamado cromatina cruda, se utilizó directamente como material para el aislamiento de las distintas fracciones de histonas, así como de las histonas totales.

Ocasionalmente se utilizó el método descrito -- por Bonner y col. (1968), que esencialmente es idéntico, variando únicamente el medio de homogeneización (ClNa 0.075M - EDTA 0.025M, pH 8). A priori tiene este procedimiento la ventaja de eliminar cationes tales como el calcio del medio, lo que hace más difícil la posible aglutinación de los núcleos y la pérdida de rendimiento subsiguiente al filtrar.

Con el objeto de purificar esta cromatina cruda, se resuspendió en tampón Tris - ClH 0.05M pH 8 hasta una concentración aproximada de 0.5 mg de DNA por ml: La suspensión se homogeneizó en un Potter-Elvehjen de vidrio con émbolo de teflón de perfecto ajuste y se sometió a -- centrifugación en gradiente discontinuo de sacarosa (Artman y Roth, 1971) en tubos de centrífuga de 50 ml. El -- gradiente se formó con 15 ml de sacarosa 2M - capa infe--rior - y 15 ml de sacarosa 1.5M - capa superior-. Sobre esta última se depositaron 10 ml de la suspensión de cromatina cruda y la centrifugación se realizó en el rotor - flotante HB4 de la centrífuga Sorvall durante tres horas a 27.000 g. El sedimento se lavó tres veces con ClNa -- 0.14M y se centrifugó en cada lavado a 12.000 g durante - 15 minutos. A este sedimento último se le denominó cromatina purificada.

2.3. AISLAMIENTO DE HISTONAS TOTALES

=====

Las histonas se obtuvieron a partir de cromatina, bien cruda o bien purificada, por dos distintos procedimientos:

- a) Disociación salina de la cromatina.
- b) Extracción con ácidos diluidos.

2.3.1. DISOCIACION SALINA DE LA CROMATINA

Se utilizó el método descrito por Dick y Johns (1969a) con ligeras modificaciones.

La cromatina se resuspendió y se lavó dos veces en aproximadamente dos volúmenes de ClNa 0.25M - Tris -- 0.01M pH 7.5, centrifugándose a 1.500 g durante 15 minutos. El objeto es eliminar lo más posible la contaminación por proteínas extracromosomales que pudieran quedar interaccionando debilmente con la cromatina (Johns y Forrester, 1969a). El anterior sedimento se resuspendió en ClNa 20(p/v) hasta una concentración final en ClNa 2M en un homogeneizador "Omni Mixer" Sorvall a 220 V durante un minuto. A continuación se mantuvo en agitación por lo menos durante 18 horas a temperaturas no superiores a 4°C. Esta operación tiene como fin el solubilizar y disociar completamente los componentes de la cromatina. El sedimento insoluble se separó por centrifugación (30.000 g durante 80 minutos) y el sobrenadante se clarificó filtrándolo a través de placa de vidrio poroso nº 4 para eliminar cualquier partícula en suspensión. Sobre el filtrado se añadió ClH 1N hasta una concentración final de 0.25N -- con lo que precipita tanto el DNA como las proteínas ácidas, permaneciendo las histonas totales en disolución. El precipitado se separó por centrifugación, y el sobrenadante (que contiene las histonas totales) se dializó frente a agua destilada durante 18 horas, con 4 ó 5 cambios de --

agua, con el fin de eliminar el ClNa que de estar presente precipitaría junto con las histonas en posteriores operaciones. Una vez realizada la diálisis, los histonas se precipitaron añadiendo ocho volúmenes de acetona y se recogieron por centrifugación; se lavaron tres o cuatro veces con acetona seca y se secaron a vacío. En ocasiones no se produjo inmediatamente la precipitación, en cuyo caso se guardó a -20°C en congelador hasta la aparición de precipitado.

La precipitación de histonas totales también se realizó con TCA 100%(p/v) hasta una concentración final del 18%. En estos casos no fue necesaria la diálisis frente a agua destilada ya que el ClNa es soluble en el TCA, aunque es preciso lavar varias veces en este medio con el fin de eliminarlo completamente. A continuación se lavó con acetona, pero al ser los tricloroacetatos de histonas bastante solubles en este medio fue necesario transformarlos en hidroccloruros para lo que se añadieron unas gotas de ClH concentrado sobre la disolución de histonas (aproximadamente 2 ml de ClH concentrado por cada 100 ml de acetona) (Johns y Butler, 1962a). Tras dos lavados en acetona-ClH (en las proporciones anteriormente indicadas), se lavaron nuevamente dos ó tres veces con acetona y se secaron a vacío.

Este procedimiento tiene la ventaja de eliminar prácticamente todo el material extracromosomal insoluble, que puede solubilizarse en cambio en medios ácidos diluidos, con lo que se hace muy aconsejable su utilización --

cuando se extraigan histonas totales a partir de "cromatina cruda". Sin embargo la precipitación de ácidos nucleicos por adición de ClH puede provocar la reasociación de algunas de las fracciones de histonas, obteniéndose - por tanto menor rendimiento de ellas en la preparación final (Ohlenbusch y col. 1967). También se puede producir agregados en medios de alta fuerza iónica y valores de pH superiores a 4 (Davison y col. 1956; Johns, 1968; Phillips, 1962).

2.3.2. EXTRACCION ACIDA

Para la preparación de histonas totales por extracción ácida de cromatina se siguió el método descrito por Johns (1967a).

Después de realizar los lavados con ClNa 0.25M - Tris 0.01M pH 7.5 de la misma forma y con el mismo objeto que se ha indicado en el caso de la disociación salina, el sedimento se resuspendió en Tris 0.01M pH 8 y se le añadió un volumen igual de ClH 0.5N. La suspensión - se agitó durante tres horas a temperaturas inferiores a - 4°C y posteriormente se centrifugó a 12.000 g durante 15 minutos. El ácido diluido solubiliza las histonas mientras que los ácidos nucleicos como las proteínas ácidas permanecen insolubles. El sobrenadante se clarificó filtrándolo a través de placa de vidrio poroso nº 4 y a continuación se precipitaron las histonas añadiendo ocho vo

lúmenes de acetona. En ocasiones se añadieron unas gotas de SO_4H_2 concentrado para favorecer la precipitación, ya que los sulfatos de histona son más insolubles que sus hidrocloruros. El precipitado se lavó varias veces con acetona y se secó a vacío.

Este procedimiento presenta varias ventajas a - priori con respecto al anteriormente expuesto. El ácido diluido inhibe, por ejemplo, la acción de las enzimas proteolíticas (Golg y Fahrney, 1964). También evita la agregación de las histonas (Sautiere y col. 1972). Sin embargo produce la desnaturalización de los materiales biológicos, no siendo ésta la única desventaja, ya que por otra parte se obtienen preparaciones más impurificadas debido a que no existe la previa eliminación de proteínas extra-cromosomales insolubles que tiene lugar en el procedimiento de la disociación salina, tal como se ha discutido.

2.4. EXTRACCION SELECTIVA DE FRACCIONES

=====

2.4.1. EXTRACCION SELECTIVA DE F1

La fracción F1 de histona se preparó a partir - de cromatina cruda por el método descrito por Johns y -- Butler (1962a).

Se añadió medio volumen de PCA 5%(p/v) con res-

pecto al peso inicial del material biológico empleado (Ce-ratitis capitata intacta) sobre la cromatina cruda y se -
homogeneizó durante 5 minutos en "Omni Mixer" sorvall a -
220 V a una temperatura inferior a 4°C. Una vez homogenei-
zado se centrifugó a 30.000 g durante 15 minutos, y el so-
brenadante se clarificó a través de placa de vidrio poro-
so nº 4, precipitando a continuación por adición de TCA
100%(p/v) hasta una concentración final del 18%(p/v). Con
el precipitado obtenido se operó de manera similar a la -
descrita en anteriores apartados para histonas totales.

Johns y Butler (1962a) discuten la extracción -
selectiva que es capaz de realizar el PCA 5%(p/v). A es-
ta concentración de PCA la única histona que permanece so-
luble es la fracción F1, mientras que las demás se preci-
pitan, pudiéndose por tanto separar selectivamente.

2.4.2. SEPARACION SELECTIVA DE LAS RESTANTES FRACCIONES

Las restantes fracciones o mezclas particulares
de las mismas se obtuvieron por tratamiento de la cromati-
na cruda con disolventes orgánicos. Así, está descrito -
que la extracción con Etanol-ClH conduce a la separación
selectiva de una mezcla de las fracciones F2A y F3 (Johns
y col. 1960).

Para realizar lo anteriormente dicho se siguió
la siguiente pauta experimental: la cromatina cruda se -
lavó dos veces con etanol 90%, tras lo cual se realizó la

extracción con etanol 80%- ClH 0.25N, en una proporción -- de 100 ml por 20 mg de DNA contenidos en la cromatina, -- manteniéndose en agitación durante 18 horas. Posterior-- mente se centrifugó durante 15 minutos a 12.000 g, añadién-- dose sobre el sobrenadante resultante cinco volúmenes de acetona. Las proteínas así precipitadas se lavaron dos -- veces con acetona y se secaron a vacío.

Johns (1967) describió un procedimiento para ex-- traer selectivamente las fracciones F2A utilizando etanol --ClGu. Se siguió este procedimiento para la extracción -- de dichas fracciones de Ceratitis capitata. Para ello la cromatina cruda se lavó dos veces con ClNa 0.25M - Tris 0.01M pH 7.5. A continuación se sometió a otros dos lava-- dos con etanol 80% con el fin de asegurar que el disolven-- te etanol-ClGu utilizado para la extracción no se diluye-- ra con el agua presente en el residuo húmedo. El sedimen-- to final se sometió a extracción con etanol 75%-ClGu -- 10%(p/v), pH 7.0 suspendiendo una cantidad de cromatina cruda equivalente a 200 mg de DNA en 100 ml del medio de extracción. La suspensión se mantuvo en agitación duran-- te 18 horas a una temperatura inferior a 4°C. A continua-- ción se centrifugó a 12.000 g durante 10 minutos. El ex-- tracto se clarificó a través de placa de vidrio poroso nº 4, y una vez clarificado se precipitaron las histonas por adición de cuatro volúmenes de acetona, lavándose el pre-- cipitado varias con acetona seca y secándose a vacío.

Este extracto de etanol-ClGu se puede subfraccio-- nar en sus dos componentes (F2A1 y F2A2) por precipitación

fraccionada con acetona (Perera, 1975). Sobre el extracto de etanol-ClGu de cromatina cruda, una vez clarificado tal como se ha indicado en el párrafo anterior, se añadió un volumen de acetona y se dejó en reposo, en frío, durante 12 horas. El precipitado se recogió por centrifugación y sobre el sobrenadante se añadieron otros tres volúmenes de acetona. Tras un nuevo reposo en frío se obtuvo otro precipitado, que nuevamente se separó por centrifugación. Ambos sedimentos, obtenidos por precipitación con uno y cuatro volúmenes de acetona sobre el extracto de etanol-ClGu se lavaron una vez con una disolución idéntica en composición al medio de donde se precipitaron, dos veces con acetona y se secaron a vacío.

2.5. AISLAMIENTO DE DNA

=====

El DNA de timo de ternera utilizado en los experimentos de precipitación, así como en los de reasociación de nucleoproteína se aisló según el método modificado de Marmur (1961) descrito por Paul y Gilmour (1968).

Se obtuvo previamente una suspensión de núcleos homogeneizando el tejido en "Omni Mixer" Sorvall durante dos minutos a 220 V en 10 volúmenes de ácido cítrico -- 0.025M y lavándolos posteriormente en el mismo medio hasta la aparición de un sobrenadante perfectamente claro. En todos los casos se centrifugó a 2.000 g durante 5 minutos. A esta suspensión de núcleos se le dió un último

lavado con Tris 0.5M, pH 7.5 y se suspendieron en 10 volúmenes de C1Na 0.15M-EDTA 0.1M pH 8. A continuación se -- añadió SDS al 10%(p/v) hasta una concentración final de -- 2%(p/v), agitándose durante una hora, después de lo cual se añadió ClO_4K 5M hasta una concentración final de 1M.

La mezcla se desproteneizó repetidas veces con cloroformo-octanol(24:1 p/v) hasta que no aparecía precipitado en la interfase. El DNA permanecía disuelto en la fase acuosa, de donde se separó precipitando con dos volúmenes de etanol. Junto con el DNA precipita también en -- esta operación el RNA. Se hizo una primera separación mecánica de ambos ácidos nucleicos enrollando con una varilla el DNA precipitado en la interfase etanol-agua, que -- por su carácter fibroso forma una madeja alrededor de la varilla de vidrio. El DNA así separado se redisolvió en la mínima cantidad posible de SSC y se le añadió ribonucleasa en una proporción de 50 μg por ml, incubando durante 30 minutos a 37°C, al cabo de los cuales se añadió pronasa en la misma proporción y se prosiguió la incubación durante dos horas. Ambas incubaciones tenían como fin -- destruir tanto el RNA como proteína que por estar más íntimamente unida al DNA no se eliminó en las anteriores -- operaciones. A continuación se desproteneizó nuevamente con cloroformo-octanol (con el fin de eliminar la pronasa añadida) y por último se precipitó el DNA con etanol, recogándose en la interfase por el procedimiento anteriormente indicado de enrollado en varilla. Se redisolvió el precipitado así obtenido en 0.01 x SSC (SSC diluido al 1%),

después de lo cual se añadió 1/9 volúmenes de acetato sódico 3M-EDTA 0.001M (pH 8), y se precipitó nuevamente -- con 0.5 volúmenes de isopropanol. El DNA así obtenido -- se lavó repetidas veces con etanol 70% y 95% y por último con etanol absoluto guardándose seco en un frigorífico hasta su posterior utilización.

Para la preparación de DNA de Ceratitis capitata se utilizó el mismo procedimiento con la única modificación de utilizar menos volumen de ~~homogeneización~~ (solamente tres volúmenes) debido a la menor proporción de -- DNA en este material, ya que si no se hacía así resultaba muy difícil su posterior precipitación. Para comprobar su pureza (contaminación por RNA y proteínas) así como para ajustar la concentración de sus disoluciones fue preciso utilizar los procedimientos detallados a continuación.

2.6. AGREGACION DE HISTONAS

=====

2.6.1. OXIDACION DE HISTONAS

Debido a la presencia de cisteína en determinadas fracciones de histonas, en condiciones oxidantes y --

adecuada concentración, se pueden establecer puentes disulfuro intercadenas produciéndose la formación de polímeros de la proteína y apareciendo como consecuencia en la electroforesis bandas de baja movilidad.

La oxidación de histonas se llevó a cabo según el método descrito por Marzluff y col. (1972) tal como se especifica a continuación.

Tanto la histona total como las distintas fracciones se disolvieron en ClGu 6M-Tris 0.3M pH 8.3 en concentraciones comprendidas entre 4 y 10 mg/ml, incubando a continuación a 27°C durante 16 horas. Una vez realizada la incubación se dializó, a temperaturas inferiores a 4°C, frente a agua destilada hasta la completa eliminación del ClGu (de cuatro a cinco cambios de agua destilada). Las histonas se precipitaron con TCA al 100%(p/v) hasta una concentración final del 18%, lavándose con acetona-ClH y acetona hasta su perfecto secado, tal como se ha descrito previamente para la preparación de histonas totales, o -- bien se liofilizó directamente.

2.6.2. SEPARACION DE F1 AGREGADA Y SIN AGREGAR

La separación de F1 agregada y sin agregar se intentó por cromatografía en gel y por electroforesis preparativa.

a) Cromatografía en gel

La cromatografía en gel separa fundamentalmente en orden a pesos moleculares, por lo que se pensó que podía ser utilizada con éxito en el presente caso, dada la gran diferencia de movilidades electroforéticas de ambos estados de la fracción F1. Esta técnica ha sido descrita utilizando diversas condiciones para la separación de las distintas fracciones de histonas sin demasiada efectividad (Cruft, 1961; Phillips y Johns, 1965; Oliver y col. 1972).

En el presente trabajo se utilizó la cromatografía descrita por Sommer y Chalkley (1974). Consistió en una cromatografía en Bio-gel P-100, en una columna de 2.4 x 85 cm equilibrada con ClH 0.01N, que también se utilizó como eluyente. La proteína se aplicó disuelta en este mismo medio a una concentración de 25 mg/ml. La elución se efectuó a un flujo de 6.5 ml/hora. Se recogieron fracciones de 2 ml y se valoró el material proteico en cada fracción midiendo la absorbancia a 230 nm en un espectrofotómetro Unicam SP 600. Las fracciones correspondientes a un mismo pico se juntaron y liofilizaron.

b) Electroforesis preparativa

La electroforesis preparativa se realizó en las mismas condiciones que la electroforesis analítica anteriormente descrita con diferencias únicamente en el tamaño del gel utilizado (5 cm de diámetro por 6 cm de largo).

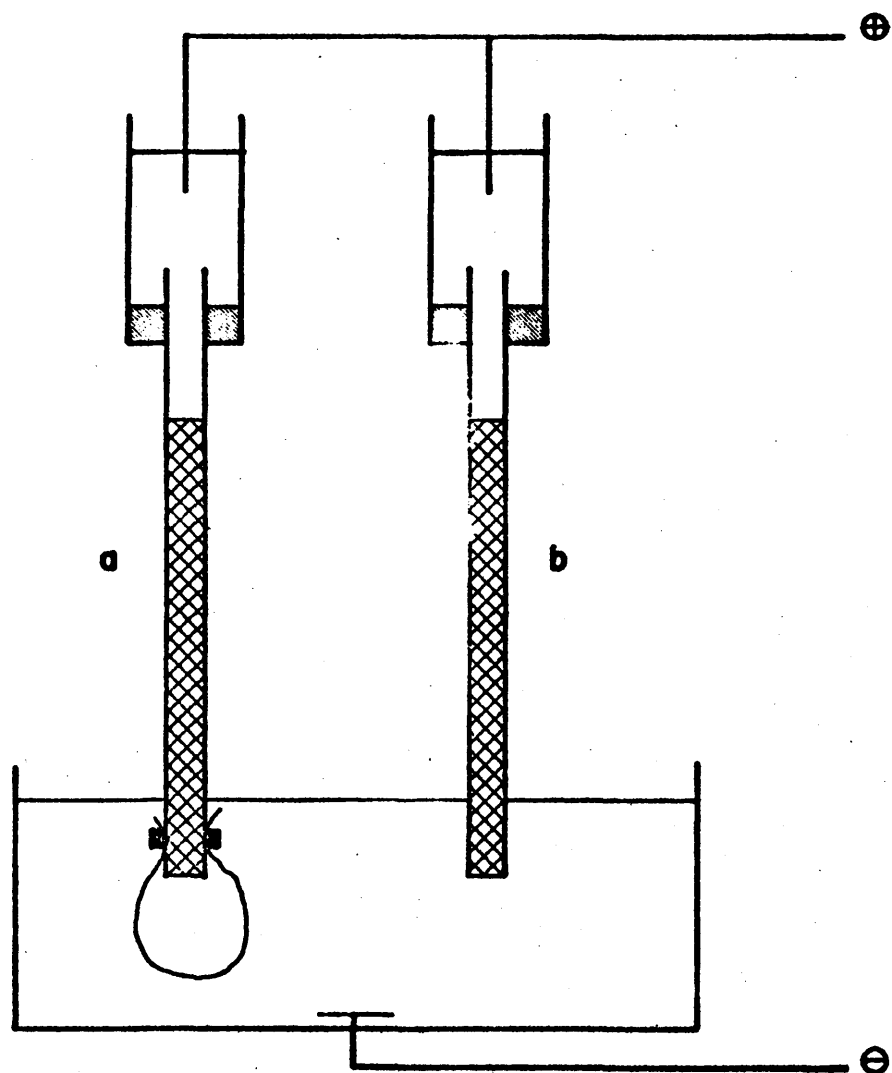


Figura 2.1..- Montaje de geles de poliacrilamida utilizados en la electroforesis preparativa.

La parte inferior del gel se encuentra encerrada en una bolsa de diálisis, tal como se esquematiza en la Figura 2.1. La aplicación de la muestra se realizó a una concentración 50 mg/ml y la electroforesis se desarrolló a 175 V a temperaturas inferiores a 4°C durante 12 horas. Transcurrido este tiempo se recogió el contenido de la bolsa de diálisis, de donde se extrajo la proteína precipitando con TCA y lavando con acetona en las mismas condiciones descritas en los apartados anteriores. A continuación se envolvió el electrodo superior con una bolsa de diálisis y se invirtió la polaridad, y transcurridas otras doce horas se extrajo en el tampón superior la proteína precipitando en las mismas condiciones anteriormente indicadas.

2.7. INTERACCION DNA-HISTONAS

=====

2.7.1. CURVAS DE PRECIPITACION

Se utilizó la técnica descrita por Johns y Forrester (1970). A alícuotas de 5 ml de una disolución de DNA en ClNa 0.14M de concentración 0.1 mg/ml se le añadieron cantidades crecientes (0.2, 0.4, ..., 2.0 ml) de una disolución de fracción de histona en ClNa 0.14M a una concentración de 1 mg/ml, mezclando por inversión, lo que produce la precipitación inmediata del DNA si ésta hubiera lugar. A continuación se centrifugó a 10.000 g duran-

te 10 minutos y se midió la absorbancia a 260 nm en el sobrenadante, con lo que se consigue saber la cantidad de DNA no precipitado. Por último se representó el porcentaje de DNA precipitado en función de la relación histona/DNA, haciendo las correspondientes correcciones de volumen.

Estos estudios se realizaron con F1 oxidada y sin oxidar frente a DNA de Ceratitis capitata y timo de ternera.

2.7.2. DISOCIACION SELECTIVA DE CROMATINA CON ClNa

A partir de cromatina cruda, obtenida tal como se ha indicado en esta misma sección, se realizaron extracciones sucesivas aumentando cada vez más la fuerza iónica del medio. La cromatina cruda se resuspendió en ClNa 0.35M - Tris 0.01M pH 7.6, manteniéndose en agitación durante dos horas, transcurridas las cuales se centrifugó a 30.000 g durante 30 minutos. Del sobrenadante se precipitaron los ácidos nucleicos con ClH 1N hasta una concentración final de 0.25N, y se siguió el mismo procedimiento que para la preparación de histonas totales descrito anteriormente. Sobre el sedimento resultante de la extracción con ClNa 0.35M - Tris 0.01M pH 7.6, previo lavado en el mismo medio, se repitieron las mismas operaciones variando la concentración del ClNa empleado (0.50, 0.75, 1.0, 1.5 y 2.0M).

Este mismo experimento se realizó utilizando en cada concentración de ClNa directamente cromatina cruda - en ClNa 0.14M.

2.7.3. FORMACION DE COMPLEJOS DNA-F1

Tanto la F1 agregada como sin agregar de Ceratis capitata se reasociaron con DNA de timo de ternera para dar complejos solubles. Estas técnicas de reconstitución del material genético, muy utilizadas por numerosos autores (Li y Bonner, 1971; Rubin y Mondrianakis, 1972; Adler y col, 1974; Hwan y col. 1975) fueron convenientemente modificadas en el presente trabajo.

Se utilizaron para la reasociación disoluciones de histona (2 mg/ml) y DNA (0.30 mg/ml) en ClNa 3M, SO_3HNa 0.05M, Urea 5M, pH 7.8 ajustando su concentración por la correspondiente valoración de ambas, filtradas por placa - de vidrio poroso y papel. A partir de estas disoluciones se prepararon mezclas conteniendo distinta relación histona/DNA (0.5, 1.0 y 1.5 p/p) y se dializaron frente a los siguientes medios durante el tiempo indicado al margen en cada caso:

ClNa 0.60M, Urea 5M, SO_3HNa 0.05M	pH 7.8	12 horas
ClNa 0.40M, Urea 5M, SO_3HNa 0.05M	pH 7.8	2 horas
ClNa 0.30M, Urea 5M, SO_3HNa 0.05M	pH 7.8	2 horas
ClNa 0.20M, Urea 5M, SO_3HNa 0.05M	pH 7.8	2 horas
ClNa 0.15M, Urea 5M, SO_3HNa 0.05M	pH 7.8	2 horas
Urea 5M	pH 7.8	2 horas

Finalmente se realizaron dos diálisis frente a 200 volúmenes de EDTA 2×10^{-4} M, pH 6.2, durante 12 horas cada una, apareciendo en todos los casos disoluciones perfectamente transparentes.

2.7.4. ESPECTROS DE CD

Los espectros de CD de los complejos Fl-DNA se registraron a $22 \pm 1^\circ\text{C}$ en un espectropolarímetro Cary 61.

El espectro barrió desde 300 nm hasta 210 nm, a una velocidad de 10 nm/min. La línea base se ajustó para el disolvente utilizando el líquido de la última diálisis de los complejos, aunque en algunos casos particulares se hicieron las correcciones de datos necesarios por referencia al espectro del disolvente. La anchura de la rendija se programó para una resolución del orden de 1 nm, constante a lo largo de las longitudes de onda barridas. Se utilizaron células de 1 cm de poro óptico y los datos se utilizaron en términos de elipticidad molar por residuo de DNA $[\theta]$, donde

$$[\theta] = \frac{326 \times 10^5}{c_{\mu\text{g}} / \text{ml}} \times \psi$$

donde c es la concentración de DNA en $\mu\text{g}/\text{ml}$ y ψ es el número de divisiones del espectro multiplicado por la escala, a cada longitud de onda determinada.

3.7.5. CURVAS DE TRANSICION

Las curvas de transición por desnaturalización térmica de los complejos reconstituídos de Fl-DNA se construyeron midiendo el efecto hipercrómico a 260 nm como una función de la temperatura. Para ello se utilizó un espectrofotómetro Varian Techtron G 35 termostatzado, equipado con un termopar en la célula de referencia que permite registrar un aumento discreto de la temperatura perfectamente controlado. Los resultados se representan en valores de efecto hipercrómico (E.H.) y tanto por ciento (%) a cada temperatura, donde

$$E.H.(T) = \frac{A_{260}(T)}{A_{260}(25^{\circ}C)}$$

$$\% (T) = \frac{A_{260}(T) - A_{260}(25^{\circ}C)}{A_{260}(máx.) - A_{260}(25^{\circ}C)} \times 100$$

A partir de las curvas de transición representadas en % frente a T se construyeron las correspondientes curvas derivadas con respecto a la temperatura, tomando los incrementos de % entre intervalos de 2°C y representando frente a la temperatura media correspondiente a cada intervalo.

2.8. METODOS ANALITICOS

=====

2.8.1. VALORACION CUANTITATIVA DE DNA

Se utilizó normalmente el método colorimétrico descrito por Dische (1930) que utiliza un reactivo de difenilamina que da coloración con la desoxirribosa. El -- procedimiento operatorio se describe a continuación.

A 1 ml de muestra problema (cuyo contenido en -- DNA se quiere saber) se le añadió un volumen doble de reactivo de difenilamina (1 g de difenilamina en 100 ml de -- ácido acético glacial y 2.75 ml de SO_4H_2 concentrado). La mezcla se calentó en baño de agua a 100°C durante diez minutos, a continuación de lo cual se enfrió rápidamente en un baño de hielo y se leyó la absorbancia a 595 nm frente a un blanco en el que la disolución problema se substituyó por agua destilada, o bien por el disolvente utilizado en la disolución problema.

La curva patrón se construyó utilizando distintas concentraciones de DNA estándar o bien de desoxirribosa. Este procedimiento es bueno para detectar cantidades comprendidas entre 50 y 500 ug/ml de DNA. Hay que tener en cuenta que determinados azúcares y derivados pueden interferir en la determinación, por dar también coloración con el reactivo de difenilamina (Burton, 1956).

En ocasiones también se valoró el DNA por absorción ultravioleta a 260 nm, sabiendo que para el DNA completamente hidrolizado el coeficiente de extinción correspondiente ($E_{1\text{ cm}}^{260}$) es de 0.224 para una disolución de --- 0.001%(p/v) (Webb y Levy, 1958). En este procedimiento se hace inexcusable la previa separación de otras especies moleculares que acompañan al DNA y también presentan absorción a esa longitud de onda, fundamentalmente RNA. Para eliminar estas sustancias que interfieren en la determinación del DNA se siguió el procedimiento descrito por Hill y col. (1971) descrito a continuación. Se precipitó con PCA 1N (donde precipitan DNA, RNA y proteínas), y se incubó el sedimento con NaOH 0.3N durante 1 hora a 37°C. En este medio se solubilizan DNA, RNA y proteínas. Después de la incubación el RNA se ha hidrolizado, mientras que el DNA no, por lo que a continuación se añadió PCA --- 3.6N hasta una concentración final de 1N con lo que precipitará el DNA, permaneciendo el RNA hidrolizado en disolución. Una vez centrifugado se le añadió al sedimento (formado exclusivamente por DNA) PCA 1.5%(p/v) y se incubó a 90°C durante 20 minutos, transcurridos los cuales la hidrólisis del DNA ha sido completa, midiéndose su concentración mediante absorbancia a 260 nm.

2.8.2. VALORACION CUANTITATIVA DE PROTEINAS

Tanto para comprobar la pureza de las preparaciones de DNA como para ajustar las concentraciones de las di

soluciones cuando ello era necesario (para curvas de precipitación, ensayos de reasociación, etc.) fue preciso determinar cuantitativamente las proteínas existentes en las disoluciones. Para ello se utilizó el método escrito por Lowry y col. (1951) tal como se detalla a continuación.

En el momento de realizar el análisis se mezclaron 50 volúmenes de reactivo A (Co_3Na_2 al 2% p/v en NaOH 0.1N) con 1 volumen de reactivo B ($\text{SO}_4\text{Cu} \times 5\text{H}_2\text{O}$ al 0.5% p/v en tartrato sódico al 1%) y se añadieron cinco ml de esta mezcla a 1 ml de la disolución problema, sometiéndolo a agitación ocasional durante 30 minutos a temperatura ambiente. Una vez transcurrido este tiempo se añadieron 0.5 ml de reactivo Folin-Ciocalteu (Folin y Ciocalteu, 1927) y se dejó en reposo con agitación ocasional durante 40 minutos, después de una resuspensión perfecta de la mezcla, después de los cuales se mide su absorbancia a 500 nm frente a un blanco donde la muestra se sustituyó por 1 ml de agua destilada. El procedimiento es válido para concentraciones de proteínas comprendidas entre 150 y 900 $\mu\text{g/ml}$). La curva patrón se construyó utilizando concentraciones conocidas de seroalbúmina de buey (Sigma Chem. Co) aunque en ocasiones se utilizó histona total de timo de ternera.

2.8.3. ELECTROFORESIS ANALITICA DE HISTONAS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

a) Electroforesis sencilla

En electroforesis en gel de poliacrilamida se reali

zó según el método descrito por Johns (1967a) a excepción de la tinción y desteñido de los geles que se llevaron a cabo con la modificación descrita posteriormente por el mismo autor (Dick y Johns, 1969a).

Los geles se prepararon en tubos de 12 cm de longitud y 0.6 cm de diámetro interno, previamente siliconados con una disolución de diclorometilsilano al 0.5% en benceno con el fin de facilitar la separación del gel una vez desarrollada la electroforesis, así como para obtener una superficie perfectamente horizontal en el gel.

La mezcla de polimerización se preparó de la siguiente manera: 16 gr de acrilamida y 0.24 gr de bisacrilamida se disolvieron en agua destilada hasta un volumen aproximado de 60 ml. Una vez que la disolución fue completa se filtró a través de papel para eliminar las posibles partículas insolubles y se le añadió 0.1 ml. Una vez que la disolución fue completa se filtró a través de papel para eliminar las posibles partículas insolubles y se le añadió 0.1 ml de TEMED, ajustándose la disolución a pH 3 con ácido acético glacial y desgasificando a continuación a vacío. Una vez desgasificado completamente se le añadieron 0.12 gr de persulfato amónico y agua destilada hasta un volumen de 80 ml. Con esta disolución se llenaron los tubos hasta una distancia aproximada de 2.5 cm de su límite superior. Los tubos se habían colocado previamente en un soporte que los mantenía perfectamente perpendiculares, tapados por su parte inferior con un tapón de goma, útil también para eliminar las posibles burbujas -- que pudieran quedar en el interior de los tubos sin más --

que presionar. La mezcla de polimerización, una vez en los tubos, se recubrió cuidadosamente con una capa de agua destilada con el fin de que no se secase la superficie del gel así como de condicionar su perfecta horizontabilidad. Se mantuvieron en reposo durante 5 horas, al cabo de las cuales la polimerización estuvo completada. Al cabo de este tiempo se retiró el agua que recubría los geles y se substituyó por ácido acético 0.01M.

Antes de utilizar estos geles para electroforesis es necesario someterlos a una preelectroforesis con el fin de eliminar el TEMED^{2+} y $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$ utilizados para su polimerización, ya que normalmente perturban las bandas de electroforesis y pueden producir artefactos. Se realizaron normalmente tres preelectroforesis (de tres horas, tres horas y seis horas, respectivamente) utilizando como tampón en ambas cubetas ácido acético 0.01N. El voltaje utilizado fue de 125 V. Al mismo tiempo que se eliminan en esta operación los iones anteriormente mencionados el gel se equilibra a la concentración adecuada de ácido acético.

Una vez terminada la preelectroforesis de los geles ya se pueden utilizar para realizar la electroforesis. Para ello se disolvieron las histonas en sacarosa 1M-ácido acético 0.002M en una proporción de 0.2 mg/ml por fracción de histonas aunque hubo veces que se disolvió en mayor proporción según la complejidad o pureza de la muestra. Los geles, previamente equilibrados, se introdujeron en la cubeta de electroforesis llenándose de ácido acético 0.01M y se aplicó cuidadosamente la disolución de muestra sobre

la superficie del gel, midiéndose el volumen con una microgeringa a la que se conectó un tubo capilar de polietileno procurando la mínima difusión en el líquido circundante, lo que no es fácil dada la alta viscosidad de la disolución de muestra. Se aplicaron normalmente de 40 a 80 μ l por gel (corrientemente se aplican dos geles por muestra en distintas proporciones). Una vez aplicada la muestra se desarrolló la electroforesis a 175 V durante 6 horas. Debido al pH utilizado las histonas migran de ánodo a cátodo. Transcurrido este tiempo los geles se recuperaron fracturando los tubos de vidrio.

Para revelar los geles se introdujeron en una disolución de negro de Alizarina al 0.5%(p/v) en etanol al 30% (p/v) y se mantuvieron en dicha disolución durante 12 horas a temperatura ambiente, al cabo de las cuales se procedió a su destiñido por sucesivos lavados en etanol al 40% en un baño de agua a 50°C. En ocasiones se tiñeron los geles con Negro Amido al 0.5%(p/v) en ácido acético 1N, en cuyo caso se destiñeron por electroforesis en sentido transversal.

Cuando fue necesaria una determinación cuantitativa de la intensidad de las distintas bandas aparecidas en la electroforesis, o medir sus distancias relativas exactas, se procedió al densitometrado utilizando un densitómetro - Canalco, modelo G, equipado con un computador para el registro automático de las áreas.

b) Electroforesis doble

Cuando fue necesario comparar inequívocamente las movibilidades electroforéticas de dos muestras se sometieron simultáneamente en el mismo gel a electroforesis aunque -- sin mezclar las muestras. Este procedimiento, denominado electroforesis doble, fue descrito por Johns (1969).

Una vez colocados los geles en las cubetas de electroforesis llenas de ácido acético 0.01N, se elevaron los geles por encima de la superficie del tampón, secando la superficie del gel con un papel absorbente. Entonces se aplicaron las muestras a ambos lados de un disco de papel, de filtro Whatman nº 1 de diámetro ligeramente inferior -- que el interior de los tubos de gel, separadas por una línea de silicona-diclorometilsilano al 0.5% en benceno, que se ha trazado previamente en el disco. El disco de papel, con las muestras aplicadas, se introdujo seguidamente en el tubo de gel, ayudándose con una varilla de vidrio hasta la perfecta adecuación a la superficie del gel, añadiendo a continuación una capa de disolvente de muestra (sacarosa 1M - ácido acético 0.02M) sobre el papel, y por último tampón hasta la superficie del tubo, siendo sumergido a continuación en la cubeta y conectada la corriente eléctrica. Todas estas operaciones han de llevarse a cabo de la forma más rápida posible para evitar difusiones.

Las muestras para electroforesis doble se disuelven en el mismo medio que para electroforesis sencilla, pero en mayor concentración (aproximadamente 2.0 mg/ml por -

fracción de histona). El teñido y desteñido de los geles se realiza de la misma forma que en la electroforesis sencilla.

2.8.4. DETERMINACION DE PESOS MOLECULARES

Aunque se han descrito diversas técnicas para - el cálculo de pesos moleculares de proteínas (sobre todo por ultracentrifugación analítica) se utilizó en este caso electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia - de SDS. La técnica, originalmente puesta a punto por Sha piro y col. (1967) ha de ser sin embargo modificada a la hora de ser empleada en histonas, tal como han descrito y discutido Panyim y Chalckley (1971).

La mezcla de polimerización se preparó mezclan- do 7.5 ml de una disolución de acrilamida 60%-N,N'matilen₂ bisacrilamida 0.4% en agua, 10.8 gr de urea, 15 mg de SDS, 50 ul de TEMED y 1.25 ml de tampón fosfato 1.0M, pH 7.6: La disolución resultante se ajustó a pH 7.6 con ClH 1N, se añadió agua destilada hasta 30 ml y finalmente 6 mg de per sulfato amónico. La polimerización tarda en realizarse de forma completa alrededor de 30 minutos.

Las muestras de histonas totales, así como las - distintas fracciones, se disolvieron para su aplicación en tampón fosfato 0.01M, pH 7.6 - SDS 0.05%. La electrofore- sis se desarrolló durante seis horas a 80 V, migrando las

proteínas en este caso hacia el polo positivo. El teñido y desteñido de los geles se realizó por los mismos procedimientos descritos para la electroforesis analítica.

En esta técnica, para poder calcular el peso molecular de una proteína, es preciso disponer de otras proteínas de peso molecular conocido, del mismo orden que -- las proteínas problema dentro de una variabilidad adecuada. En el presente caso se utilizaron como patrón las histonas totales de timo de ternera cuyos pesos moleculares son perfectamente conocidos (Delange y col. 1969; Iwai y col. 1970; Hnilica y col. 1970; Hnilica, 1967; Teller y col. 1965; Phillips y Clarker, 1970).

Para calcular el peso molecular de una fracción determinada se aplicó en un gel una muestra de la misma -- junto con histona total de timo de ternera. Paralelamente en otro tubo de electroforesis se aplicó únicamente -- histona total de timo para poder identificar la fracción cuyo peso molecular se quiere calcular. Densitometrando los geles y representando gráficamente el logaritmo de pesos moleculares frente a movilidades relativas ha de resultar una línea recta, donde interpolando es fácil conocer el peso molecular de cualquier proteína sin más que calcular su movilidad relativa. La movilidad relativa se calculó aplicando la siguiente expresión:

$$M_r = \frac{\text{Distancia origen del gel a fracción X}}{\text{Distancia origen del gel a F2A1 de timo}}$$

La técnica posee serias limitaciones. El error cometido para las histonas de timo de ternera es del 3%, por lo -- que los pesos moleculares solo se pueden considerar como aproximados.

2.8.5. ANALISIS DE AMINOÁCIDOS

Para calcular la composición de aminoácidos tanto de las histonas totales como de las distintas fracciones se sometieron las proteínas a hidrólisis ácida con -- ClH azeótropo, que contenía fenol al 0.1%, en una concentración de 1 mg/ml a 10°C en tubos Pyrex cerrados en los que se había hecho previamente el vacío. Una vez efectuada la hidrólisis se abrió el tubo, se desecó a vacío y se lavó repetidas veces con agua destilada hasta completa -- eliminación del ClH.

El residuo seco se disolvió en tampón citrato, pH 2.2, en una concentración de 1 mg/ml y se aplicó en un analizador automático de aminoácidos Durrum modelo D-500, provisto de un computador PDP-3M que automáticamente realiza todas las operaciones de acuerdo con un programa -- previamente seleccionado. El tiempo de análisis fue de 100 minutos. El proceso de elución se efectuó con disoluciones tampón de citrato sódico a valores de pH 3.25, 4.25 y 7.09.

Generalmente se realizaron hidrólisis de la misma muestra a diferentes tiempos (18, 26 y 36 horas) con --

el fin de extrapolar los resultados a tiempo cero para - aquellos aminoácidos que se modifican en la hidrólisis - ácida - Tyr, Ser y Thr - y para corregir los valores de aquellos residuos que como la valina e isoleucina forman enlaces peptídicos más resistentes a la hidrólisis.

2.8.6. CROMATOGRAFIA DE DNA EN DEAE-CELULOSA

Para controlar la heterogeneidad de tamaño molecular del DNA utilizado tanto en pruebas de precipitación como de reasociación se utilizó la cromatografía -- discontinua centrifugada en DEAE-celulosa, descrita previamente por Davila (1965) y expuesta a continuación.

0.5 gr de DEAE-celulosa se resuspendieron cuidadosamente en 15 ml de agua destilada y esta suspensión se depositó en la parte superior de un tubo de centrifuga especialmente diseñado que consta de dos cámaras (superior e inferior) separadas por una placa perforada, -- desmontables y unidas entre sí por una rosca. Se centrifugó durante 2 minutos a la mínima velocidad. El agua -- pasó a la parte inferior de la cámara y se volvió a re-- suspender y centrifugar en las mismas condiciones. A -- continuación se pasó a su través 10 ml de una disolución de DNA en 0.1 x SSC a una concentración aproximada de 6 unidades de absorbancia y se centrifugó durante dos minutos en las mismas condiciones. La centrifugación acelera el proceso cromatográfico, pero no es conveniente apli

que mucha velocidad ya que es necesario que se establezca perfectamente el equilibrio para conseguir una buena resolución, y si se acelera excesivamente la operación - éste aparece perturbado. Con esta operación el DNA queda fijado a la DEAE-celulosa, de la cual se separó con respecto a sus diferentes tamaños moleculares haciendo pasar sucesivos eluyentes, cuya composición se expresa en la siguiente tabla:

<u>Eluyente</u>	<u>Composición</u>	<u>Tamaño molecular del DNA eluido</u>
II	PO_4H^- 0.01M, ClNa 0.14M, pH 7	Nucleótidos, <u>ol</u> igonucleótidos
III	PO_4H^- 0.01M, ClNa 0.50M, pH 7	Oligonucleótidos hasta 1×10^6 Daltons
IV	PO_4H^- 0.01M, ClNa 1.0M, pH 7	1×10^6 Daltons
V	ClNa 2M, NH_4OH 0.2M	3×10^6 Daltons
VI	ClNa 2M, NH_4OH 0.4M	1×10^7 Daltons
VII	ClNa 2M, NH_4OH 1.0M	2×10^7 Daltons
VIII	NaOH 1M	5×10^7 Daltons

El peso molecular de cada fracción fue determinado por Dávila, Charles y Ledoux (1965) mediante la viscosidad del eluido. Mingot y Dávila (1974) han revisado los valores de los pesos moleculares de las fracciones obtenidas mediante ultracentrifugación y viscosimetría.

La concentración de cada fracción se obtuvo midiendo la absorbancia a 260 nm.

RESULTADOS Y DISCUSION

III.- RESULTADOS Y DISCUSION

=====

3.1. AISLAMIENTO DE HISTONAS TOTALES

=====

La primera etapa de este trabajo consistió en la preparación de histonas totales del insecto Ceratitis capitata y la identificación de sus fracciones. Para -- ello se utilizó en primer lugar el método descrito para adulto de Drosophila melanogaster por Dick y Johns (1969a) dada la similitud del material biológico empleado. Posteriormente se utilizó el procedimiento de la extracción -- ácida de la cromatina cruda descrito por Johns (1967) y -- se compararon los resultados obtenidos. En el presente -- trabajo se restringe el estudio al estado de adulto farato por ser con el que se obtiene mayor rendimiento y preparaciones más puras.

3.1.1. DISOCIACION SALINA

La cromatina cruda se aisló de adulto farato de Ceratitis capitata (apartado 2.2) y la preparación de his

tonas totales a partir de esta cromatina se realizó tal como se ha descrito en el apartado 2.3. Las proteínas así obtenidas se caracterizaron por electroforesis (apartado 2.6.3) y se analizó su composición de aminoácidos (apartado 2.6.5).

En la Figura 3.1A se muestra la imagen electroforética de las histonas totales así extraídas. En la parte B de la figura se exponen, para su comparación, -- las histonas obtenidas por el mismo procedimiento a partir de timo de ternera. Ambas preparaciones se aplicaron en electroforesis doble y el resultado se encuentra en la parte C de la figura, donde se pueden comparar inequívocamente la movilidad electroforética de todas las -- bandas. Se observa en primer lugar la presencia de dos bandas de gran intensidad con menor movilidad que la F1 de timo de ternera, y la ausencia de banda con idéntica movilidad que la F2A1 de timo de ternera. Este último -- hecho puede extrañar en una primera apreciación, ya que la fracción F2A1 es de todas las histonas la más conservativa, encontrándose en todos los materiales observados y no variando su movilidad electroforética como consecuencia de las pequeñas diferencias encontradas en su secuencia de aminoácidos a lo largo de la evolución (De-- lange y col. 1969). Sin embargo se puede explicar la -- aparente ausencia de esta fracción en la preparación debido a su difícil disociación a fuerzas iónicas altas -- (Wilhelm y Champagne, 1969) y su fácil autoagregación -- (Diggle y Peacocke, 1971), siendo fácil que no se haya -- extraído o bien que se haya eliminado en las distintas -- etapas de la preparación.

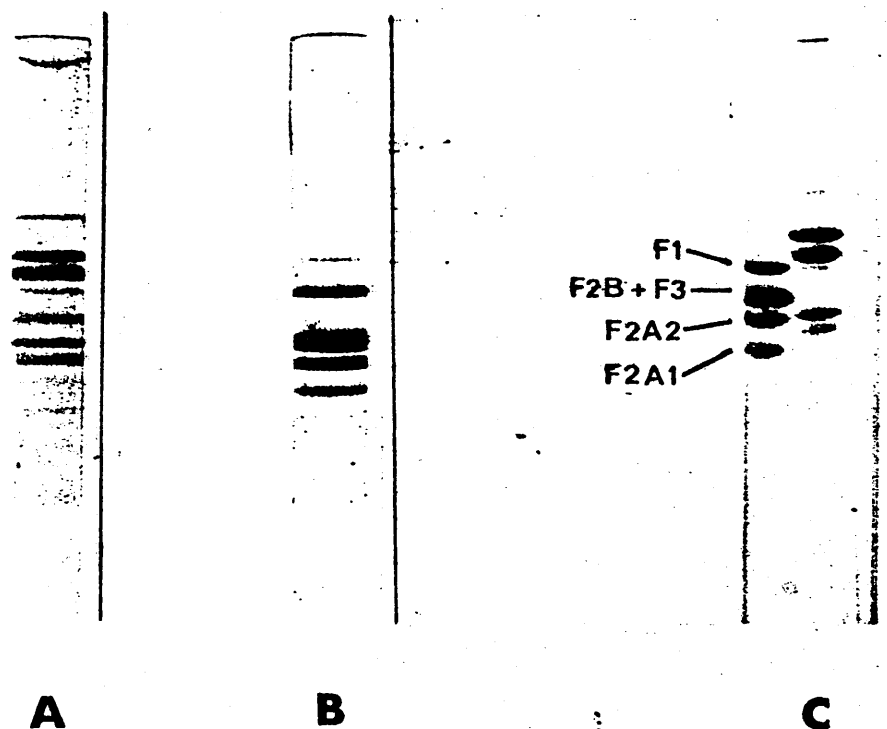


Figura 3.1.- Electroforesis en gel de poliacrilamida.
 (A) Histonas totales de adulto farato de Ceratitidis ca
pitata, extraídas con ClNa 20%, a partir de cromatina
 cruda. (B) Histonas totales de timo de ternera extraí
 das por el mismo procedimiento. (C) Electroforesis do
 ble de histonas totales de timo de ternera (izquier
 da) e histonas totales de adulto farato de Ceratitidis
capitata extraídas por disociación salina de cromati
 na cruda (derecha).

La imagen electroforética aparece bastante clara y aparentemente no contaminada con fracciones de baja movilidad, que indicaría la presencia de proteínas no -- histonas. Unicamente, como se observa en la figura, aparece una banda de muy baja movilidad, casi en la superficie del gel, pero que no se trata de una contaminación, ya que como se verá en secciones posteriores está constituida por un estado de agregación de la fracción F1. En cambio también se puede ver en la figura la desigual extracción de las distintas fracciones, hecho similar al -- encontrado por Dick y Johns (1969) en sus preparaciones a partir de adulto de Drosophila melanogaster.

En la Tabla 3-I se muestra el análisis de aminoácidos de esta preparación, comparada con el correspondiente a histonas totales de Drosophila melanogaster -- (Dick y Johns, 1969) y timo de ternera (Loeb, 1968). Se observa en la preparación de histonas totales de adulto farato de Ceratitis capitata una alta proporción de los aminoácidos treonina y arginina, a pesar de no existir -- en esta preparación proteína de idéntica movilidad que -- la F2A1, proteína precisamente rica en arginina. Como -- consecuencia aumenta la proporción de aminoácidos básicos a ácidos (B/A) y en cambio la relación Lys/Arg disminuye. Sin embargo este hecho es fácilmente aplicable, -- ya que como se verá, una de las bandas corresponde a una proteína contaminante no histona que presenta una alta -- proporción de arginina y treonina.

T A B L A 3-I

Composición de aminoácidos de histonas totales de adulto farato de Ceratititis capitata extraídas por disociación salina con NaCl 20%, de cromatina cruda, comparadas - con las de otros organismos.

Aminoácido	Moles por 100 moles		
	Ceratititis capitata Adulto farato	Drosophila melanogaster (1)	Timo de ternera (2)
Acido aspártico	8.2	8.8	4.9
Treonina	10.9	5.4	5.6
Serina	5.6	7.0	5.1
Acido glutámico	9.0	12.4	8.5
Prolina	5.5	4.7	4.6
Glicocola	7.6	8.5	9.3
Alanina	11.3	11.7	13.1
1/2 Cisteína	-	-	-
Valina	6.3	5.2	6.4
Metionina	tr	0.2	tr
Isoleucina	3.0	3.3	4.4
Leucina	3.0	7.7	8.0
Tirosina	0.3	1.2	2.6
Fenilalanina	0.9	2.0	1.9
Lisina	16.0	16.2	15.0
Histidina	1.0	1.8	1.9
Arginina	11.2	5.8	8.8
B/A	1.6	1.1	1.9
Lys/Arg	1.4	2.8	1.7

(1) Dick y Johns, 1969.

(2) Loeb, 1968.

3.1.2. EXTRACCION ACIDA

Se realizó según se describe en el apartado --
2.3.2. En la Figura 3.2A se muestra la imagen electroforética de dicha preparación. Se observa la presencia de un abundante número de bandas intensas, siendo muy dudoso que todas ellas correspondan a histonas. En la parte B de la figura se puede ver una preparación de -- histonas totales de timo de ternera extraídas por el -- mismo procedimiento. Para mayor seguridad en la comparación de bandas se realizó electroforesis doble, tal -- como se muestra en la parte C de la misma figura donde sí se observa ya la presencia de una banda de igual movilidad que la F2A1 de timo de ternera. También coincide la siguiente banda en movilidad, que se corresponde con F2A2 de timo de ternera. Aparece una banda de movilidad intermedia entre la F2B + F3 y F2A2 de timo y otra entre la F1 y F2B + F3. Las restantes tienen menor movilidad que la F1 de timo de ternera. Una de ellas ha de corresponder seguramente a la F1, ya que en Drosophila melanogaster aparece también con menor movilidad -- (Dick y Johns, 1969) así como en Acheta domestica y Planococcus citri (Pallotta y Berlowitz, 1970).

Se observa también la homogénea proporción en la cual se obtienen las distintas fracciones en esta -- preparación.

En la Tabla 3-II se muestra el análisis de -- aminoácidos de esta preparación, comparado con el corres

T A B L A 3-II

Composición de aminoácidos de histonas totales de adulto farato de Ceratitis capitata obtenidas por extracción ácida de cromatina cruda comparada con la composición de -- histonas de Drosophila melanogaster (Oliver y Chalkley, -- 1972 a).

Aminoácido	Moles por 100 moles	
	Ceratitis capitata Adulto farato	Drosophila melanogaster
Acido aspártico	11.0	8.2
Treonina	4.4	6.0
Serina	3.8	6.4
Acido glutámico	17.5	11.1
Prolina	4.2	4.6
Glicocola	8.1	8.5
Alanina	9.0	12.0
1/2 Cisteina	tr	-
Valina	6.9	5.5
Metionina	1.2	0.4
Isoleucina	5.7	4.3
Leucina	6.0	7.4
Tirosina	1.4	1.9
Fenilalanina	2.7	2.2
Lisina	9.3	12.4
Histidina	1.7	1.8
Arginina	7.1	7.3
B/A	0.6	1.2
Lys/Arg	1.3	1.7



Figura 3.2.- Electroforesis en gel de poliacrilamida. (A) Histonas totales de adulto farato de Ceratitis capitata, extraídas con ClH 0.25N a partir de cromatina cruda. (B) Histonas totales de timo de ternera. (C) Electroforesis doble de histonas totales de adulto farato de Ceratitis capitata, extraídas con ClH 0.25N a partir de cromatina cruda (izquierda), e histonas totales de timo de ternera (derecha).

pendiente a extracciones similares de Drosophila melanogaster. Aparece una proporción B/A inferior a la unidad lo que indica una gran contaminación de proteínas no histonas, aunque la proporción de los restantes aminoácidos es muy parecida. Como se puede observar disminuye mucho la proporción de arginina y treonina en comparación con la preparación de extracción salina. En principio la extracción ácida de cromatina proporciona todas las fracciones de histonas, aunque muy contaminadas. Se hacía preciso por tanto realizar la extracción sobre cromatina purificada. En la Figura 3.3A se muestra la imagen electroforética de esta preparación, donde se observa un aumento en la intensidad de seis bandas, que deben corresponder a histonas, y se numeran tal como se indica en la figura. La parte B corresponde a la preparación por disociación salina. Se observa la perfecta correspondencia de todas las bandas, con la ausencia de algunas en la preparación por disociación salina. No obstante sigue observándose contaminación, lo que indica la no total purificación de la cromatina. En la Tabla 3-III se muestra la composición de aminoácidos de esta preparación. Si bien ha aumentado considerablemente la relación B/A sigue siendo menor que la unidad. También presenta una considerable proporción de treonina y una baja relación Lys/Arg. Esta baja proporción de aminoácidos básicos se encuentra también, aunque no tan pequeña, en Drosophila melanogaster, y puede atribuirse, no solamente a impurificaciones de la muestra, sino a una mayor proporción de aminoácidos ácidos en la fracción F1 (Cohen y Gotchel, 1971), aunque también presentan altas proporciones otras fracciones del mismo insecto (Oliver y Chalkley, 1972).

92

T A B L A 3-III

Composición de aminoácidos de histonas totales de Ceratitis capitata en el estado de adulto farato, obtenidas por extracción ácida de cromatina purificada.

<u>Aminoácido</u>	<u>Moles por 100 moles</u>
Acido aspártico	8.5
Treonina	7.2
Serina	6.3
Acido glutámico	12.5
Prolina	2.9
Glicocola	7.8
Alanina	10.3
1/2 Cisteina	-
Valina	6.7
Metionina	1.0
Isoleucina	4.5
Leucina	7.5
Tirosina	2.6
Fenilalanina	2.5
Lisina	9.5
Histidina	1.8
Arginina	8.4
B/A	0.9
Lys/Arg	1.1



Figura 3.3.- Electroforesis en gel de poliacrilamida.
 (A) Histonas totales de adulto farato de Ceratitis ca
pitata, extraídas con ClH 0.25N a partir de cromatina
 purificada. (B) Histonas totales de adulto farato de
Ceratitis capitata extraídas, por disociación salina
 con ClNa 20%, a partir de cromatina cruda.

Las bandas principales se han numerado según su
 movilidad.

3.1.3. DISCUSION SOBRE LOS METODOS DE PREPARACION DE HISTONAS TOTALES

Se utilizaron, tal como se ha visto en las anteriores secciones, para la preparación de histonas totales los procedimientos de extracción ácida y disociación salina. La extracción de histonas de insectos entraña grandes dificultades debido, en primer lugar, al bajo rendimiento en las preparaciones (se obtienen alrededor de 120 mg de histona total a partir de 1 kg de material inicial) y a la gran impurificación de estas preparaciones. La extracción ácida (Dick y Johns, 1969), que extrae con seguridad todas las fracciones en aproximadamente la misma proporción, da lugar a preparaciones muy contaminadas cuyo análisis de aminoácidos revela una composición algo anormal, por su proporción B/A menor que la unidad, así como por sus altas proporciones de treonina. Se pueden mejorar las preparaciones purificando previamente la cromatina por centrifugación a través de gradiente de sacarosa, aumentando la proporción B/A y obteniéndose imágenes electroforéticas más claras, donde si bien parece desaparecer la incertidumbre sobre qué bandas son contaminantes, siguen existiendo no obstante impurificaciones. Aunque el número de seis bandas que presumiblemente corresponden a histonas puede parecer excesivo (las histonas totales de la mayoría de los organismos solo se resuelven en cuatro o cinco bandas) es preferible no descartar ninguna a priori, sino tratar de investigar su naturaleza y procedencia, ya que en la escasa bibliografía que existe sobre

la extracción ácida de histonas de insectos se describe la existencia de cinco o seis bandas en sus imágenes -- electroforéticas (Pallotta y Berlowitz, 1970; Oliver y Chalkley, 1972; Alfageme y col. 1974).

La extracción mediante previa disociación salina a altas fuerzas iónicas daba lugar a preparaciones que se resolvían electroforéticamente en imágenes más sencillas, aparentemente menos contaminadas, y cuyo análisis de aminoácidos tenía una proporción de B/A superior a la unidad, pero que por el contrario poseían serias anomalías, como era la ausencia de la banda correspondiente a F2A1 de timo de ternera (banda 1) y la aparición de una banda de menor movilidad que la F1 que en las preparaciones de extracción ácida no se ve aumentada a pesar de la purificación de la cromatina, y la anormal relación de Lys/Arg (muy baja) y del aminoácido treonina.

Por tanto se hacía preciso la completa caracterización de cada banda concreta para tener la plena seguridad de que se trataba de histonas y a qué fracciones correspondían.

3.2. IDENTIFICACION DE LAS BANDAS DE LAS IMAGENES ELECTROFORETICAS DE LAS PREPARACIONES DE HISTONAS TOTALES

Para la identificación de las diferentes ban-

das electroforéticas se recurrió a los distintos métodos de fraccionamiento descritos en la bibliografía, fundamentalmente la extracción selectiva con ácidos y mezclas de disolventes acuoso-orgánicos. Con ello se pretendía aislar fracciones semejantes a las identificadas en otros materiales biológicos y poder asignarles su identidad.

3.2.1. EXTRACCION SELECTIVA CON ACIDOS

En la bibliografía se ha descrito que el PCA -- 5%(p/v) extrae selectivamente la fracción F1 a partir de cromatina (Johns y Butler, 1962). La extracción se realizó tal como se especifica en el apartado 2.4.1. La imagen electroforética de la preparación se muestra en la Figura 3.4A; en la parte B de la figura se observa una electroforesis doble frente a histonas totales de adulto faro de Ceratitis capitata, donde se observa la perfecta -- coincidencia con la banda 6. Existe una contaminación -- por una banda de menor movilidad electroforética que dicha fracción que también aparece en las preparaciones de histona total. Alfageme y col. (1974) también obtienen -- en sus preparaciones de histonas totales de Drosophila melanogaster una fracción de características electroforéticas similares, aunque una vez aislada por electroforesis preparativa demuestra una composición de aminoácidos no -- típica de histonas.

En la Tabla 3-IV se muestra la composición de -- aminoácidos de esta preparación comparada con la fracción

T A B L A 3-IV

Composición de aminoácidos de la proteína extraída con PCA 5% sobre cromatina cruda de adulto farato de Ceratitis capitata comparada con la de otros organismos.

Moles por 100 moles

Aminoácido	Ceratitis capitata Adulto farato	Drosophila melanogaster		Timo de ternera
		(1)	(2)	
Acido aspártico	5.2	5.8	6.5	2.5
Treonina	7.3	6.4	7.8	5.6
Serina	11.2	11.2	10.3	5.6
Acido glutámico	6.5	7.5	7.4	3.7
Prolina	5.0	5.9	6.4	9.2
Glicocola	7.6	6.7	7.8	7.2
Alanina	15.4	14.4	18.1	24.3
1/2 Cisteina	tr	tr	-	-
Valina	5.7	7.1	6.1	5.4
Metionina	0.5	tr	0	-
Isoleucina	2.3	3.5	2.5	1.5
Leucina	3.6	4.6	3.3	4.5
Tirosina	1.3	0.9	1.0	0.9
Fenilalanina	0.8	1.6	1.0	0.9
Lisina	23.0	19.5	20.5	26.8
Histidina	2.3	1.0	0.8	tr
Arginina	2.1	3.7	2.3	1.8
B/A	2.3	1.8	1.7	4.6
Lys/Arg	10.9	5.2	8.9	14.9

(1) Cohen y Gotchel, 1971.

(2) Oliver y Chalkley, 1972 a.

(3) Johns, 1971.

F1 de Drosophila melanogaster y timo de ternera. Como -- puede comprobarse el contenido de aminoácidos es bastante semejante al de Drosophila melanogaster, y presenta diferencias notables con respecto al de timo de ternera. Debido a ambos hechos (extracción selectiva y composición de aminoácidos) se puede asignar la banda 6 como correspondiente a la fracción F1. La baja movilidad electrofórica parece ser un hecho común a las F1 de insectos, -- pues fue también observado en Drosophila melanogaster -- (Dick y Johns, 1969) y Acheta domestica (Pallotta y Berlowitz, 1970). Por otra parte, aunque la presencia de cisteína se consideraba característica exclusiva de la histona F3 (Johns, 1971) y de la F2A1 de equinodermos (Subirana, 1971), Alfageme y col. (1974) pusieron de manifiesto su presencia en la histona F1 de Drosophila, por lo que -- las particularidades de la composición del material extraído con PCA a partir de Ceratitidis capitata, encajan bien -- dentro de las descritas para la histona F1 de insectos. Otro hecho característico de esta fracción aislada de Ceratitidis capitata, también común en Drosophila melanogaster, es la alta proporción de serina.

3.2.2. FRACCION 5. NATURALEZA Y PROPIEDADES

Cuando después de precipitar en el extracto de PCA 5% con TCA hasta una concentración del 18%(p/v) se seguía añadiendo TCA al sobrenadante aparecía nuevamente un precipitado a una concentración aproximada de TCA 30%(p/v). Este precipitado se lavó con acetona-ClH y acetona, tal --

como normalmente se hace con las preparaciones de histonas. Su imagen electroforética se muestra en la Figura 3.5A, donde se observa que está formada por una única banda, que en electroforesis doble (parte B de la Figura) revelaba tener la misma movilidad que la banda 5. Para comprobar claramente que se trataba de la misma proteína y no de otra con semejante movilidad se planeó la siguiente experiencia: la histona total extraída por disociación salina (Figura 6.3A) se redisolvió en ClNa 0.14M. A continuación se precipitó con TCA hasta una concentración de 18%(p/v) y el precipitado se lavó con acetona- ClH y acetona. La imagen electroforética de esta preparación se muestra en la Figura 3.6B, donde se observa la ausencia de la banda 5, que permanecía soluble a esta concentración de TCA. Si sobre el sobrenadante de la anterior precipitación se continuaba añadiendo TCA hasta una concentración del 30%(p/v) se obtenía de nuevo un precipitado cuya imagen electroforética correspondía a la banda 5. Por tanto esta fracción, que se obtiene en las preparaciones precipitadas con acetona, permanece soluble cuando la precipitación se efectúa con TCA hasta una concentración del 18%(p/v).

La composición de aminoácidos de esta fracción se muestra en la Tabla 3-V(A). En ella se observa la alta proporción de treonina y arginina, así como la baja proporción del resto de los aminoácidos. En la parte B de la tabla se recoge el análisis de aminoácidos de la histona total obtenida por disociación salina y precipitada con TCA hasta una concentración del 18%(p/v). En ella

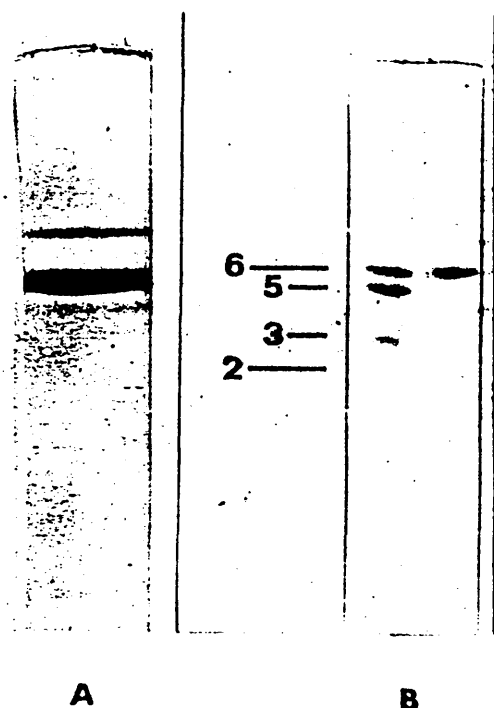
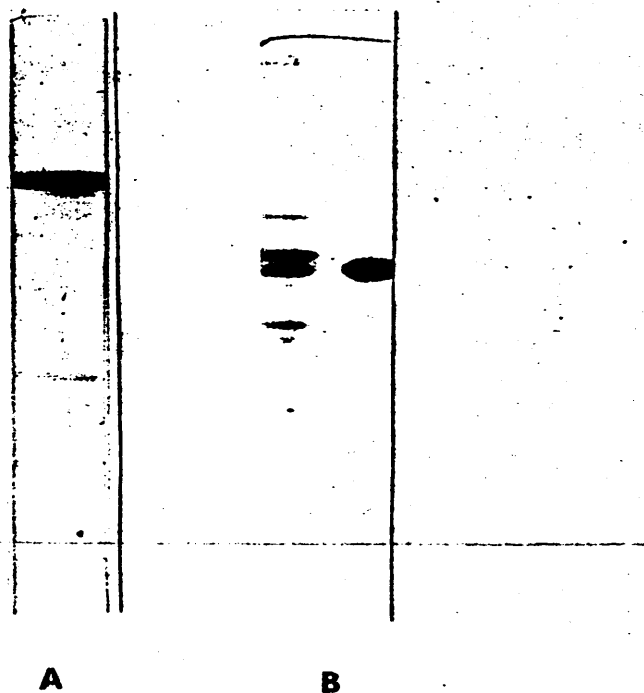


Figura 3.4.- Electroforesis en gel de poliacrilamida. (A) Proteínas extraídas con PCA 5% de cromatina cruda de adulto farato de Ceratititis capitata. (B) Electroforesis doble de histona total de adulto farato de Ceratititis capitata extraídas por disociación salina (izquierda) y proteína extraída del mismo material con PCA 5%.

Figura 3.5.- (A) Electroforesis de la proteína soluble en TCA 18% e insoluble en TCA 30% de cromatina cruda de adulto farato de Ceratititis capitata. (B) Electroforesis doble de dicha proteína (derecha) frente a histonas totales de timo de ternera



T A B L A 3-V

Composición de aminoácidos de A) Fracción 5, B) Histonas totales de disociación salina precipitadas con - TCA 18%, y C) Fracción soluble en TCA 18% precipitada con TCA 30%.

Aminoácido	Moles por 100 moles		
	A	B	C
Acido aspártico	4.5	8.9	2.7
Treonina	34.4	5.8	29.7
Serina	3.9	8.1	3.2
Acido glutámico	3.4	10.1	2.3
Prolina	5.7	5.8	6.4
Glicocola	3.9	7.2	3.2
Alanina	3.4	11.6	3.6
1/2 Cisteina	0.0	tr	-
Valina	2.8	4.3	3.7
Metionina	0.0	0.6	-
Isoleucina	0.6	3.5	-
?	12.4	-	17.8
Tirosina	tr	1.7	-
Fenilalanina	tr	1.2	-
Lisina	2.3	17.3	2.7
Histidina	0.0	2.0	-
Arginina	22.6	6.4	24.7
B/A		1.3	
Lys/Arg		2.7	

se observa un claro decrecimiento en la proporción del -- aminoácido treonina y arginina con respecto a los precipitados con acetona (C), que está más de acuerdo con el análisis de aminoácidos de histonas totales de Drosophila melanogaster. Por tanto no cabe duda de que es la presencia de esta fracción en las preparaciones de histonas totales la que perturba de forma sustancial su composición de aminoácidos.

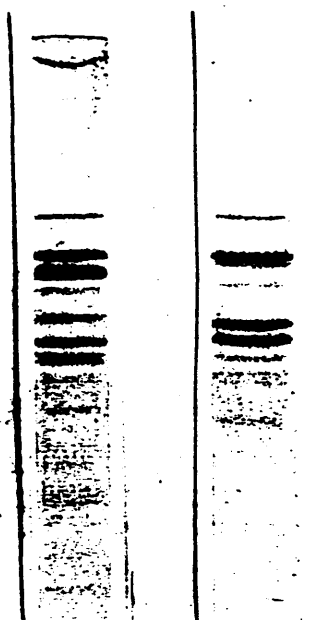
La anómala composición de aminoácidos de esta proteína (abundante proporción de treonina y arginina, alta proporción de un producto de hidrólisis no identificado de tiempo de elución comprendido entre la isoleucina y tirosina) hacían sospechar que se trataba de una proteína extranuclear. Más bien parecía una proteína estructural del tipo del colágeno. No parecía pues que se trataba de una histona, sino más bien de un contaminante que acompañara a la preparación de cromatina en todas sus fases. -- Otro hecho comprobado era la ausencia de esta banda en -- las preparaciones de histonas totales de larva y adulto -- de Ceratitis capitata (Rojo, 1975). La hipótesis de que se tratara de una proteína constitutiva del pupario (envoltura externa del adulto farato) era plausible y se trató de comprobar. Para ello se sometió a dicha pupario, -- convenientemente separado del resto del material del adulto farato, a las mismas condiciones de homogeneización y extracción que para la preparación de la proteína correspondiente a la banda 5 anteriormente descrita. Se obtenía una preparación cuya imagen electroforética revelaba una única banda de idéntica movilidad que la fracción 5,

y cuya composición de aminoácidos era semejante a la de dicha fracción, por lo que se pudo concluir que la banda 5 no correspondía a una proteína básica nuclear, sino a una proteína contaminante constitutiva del pupario. Muy bien puede suceder que esta proteína, liberada del pupario en alguna de las fases de la preparación de la cromatina, se asocie a ella dado su fuerte carácter básico y se separe luego en los procedimientos de extracción de histonas. De hecho se asocia a cromatina de hígado de rata en proporción semejante a la que se encuentra de fracción F1. Para comprobar tal extremo se añadió fracción correspondiente a la banda 5 en exceso a una preparación de cromatina de hígado de rata. Esta operación tuvo dos consecuencias: cambió completamente el aspecto físico de la cromatina (de un aspecto gelatinoso pasó a ser compacto y opaco) y a pesar de los sucesivos lavados que se realizaron con ClNa 0.25M, permanecía unida una fracción residual de la proteína correspondiente a la banda 5, que posteriormente se extraía por los procedimientos ya descritos, en proporciones semejantes a la F1 del mismo material (Figura 3.7).

El primer hecho puede explicar el anormal aspecto físico que adquieren las preparaciones de cromatina de adulto farato de Ceratitis capitata así como su difícil solubilización (Rojo, 1975).

Otra propiedad revelante es su relativo peso molecular. Su cálculo se realizó por electroforesis en SDS tal como se especificó en el apartado 2.6.4, y resultó --

ser de 18.000 (Figura 3.13). Este peso molecular es bastante menor que el correspondiente a F1 de timo de ternera (21.000). A pesar de ello presenta una movilidad electroforética bastante inferior a dicha fracción, tal como se puede observar en la Figura 3.1D. Al mismo tiempo presenta una carga neta positiva aproximadamente igual a la F1 de timo de ternera, tal como se puede deducir de la -- comparación de sus análisis de aminoácidos. Por esta razón habría que esperar una movilidad electroforética, a la vista de su relación carga/masa, superior a la F1 de timo de ternera. Este hecho contradictorio puede deberse a dos distintas razones: o bien la proteína por tener una composición tan característica de aminoácidos, adquiere una conformación peculiar que le dificulta el paso a través de un gel de esa reticulación (20% en acrilamida), o por el contrario no se trata únicamente de una cadena polipeptídica, sino que está unida a un grupo prostético, que no ha de tener gran influencia en el cálculo de pesos moleculares por electroforesis en SDS, ya que en dicho -- procedimiento solo tienen influencia decisiva los polipéptidos, pero que en cambio sí tendrá consecuencias en la -- movilidad electroforética. El primer hecho, de ser cierto, perturbaría el resultado de su peso molecular enormemente, ya que el procedimiento de cálculo de pesos moleculares en electroforesis en presencia de SDS solo está concebido para proteínas que posean una homogeneidad estructural, por ejemplo, que sean globulares (Shapiro y col., 1967) o con alguna particularidad estructural común (Panyi y Chalkley, 1971).

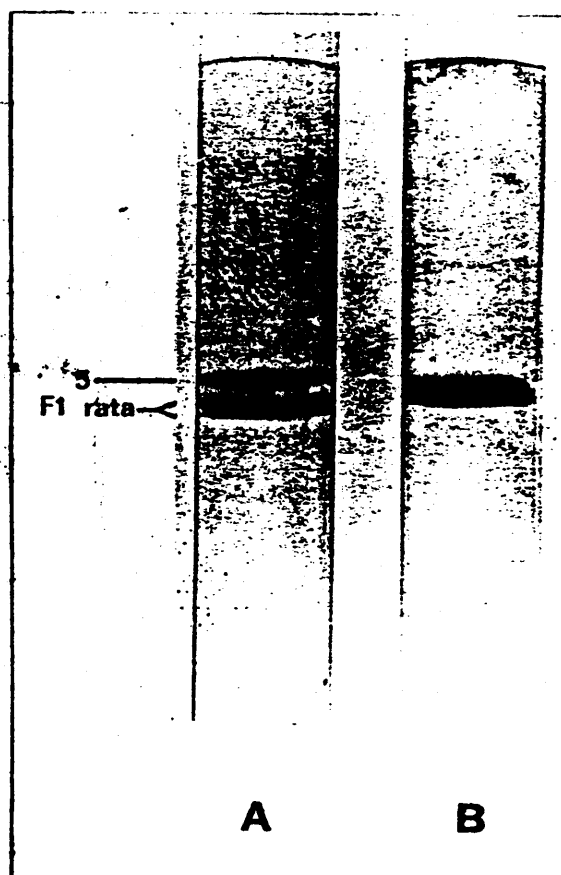


A

B

Figura 3.6.- (A) Electroforesis de histona total de adulto farato de Ceratitis capitata. (B) Histona total de adulto farato de Ceratitis capitata, redissueta en ClNa 0.14M y precipitada con TCA 18% (p/v).

Figura 3.7.- Electroforesis en gel de poliacrilamida. (A) Proteínas extraídas con PCA 5% y precipitadas con TCA 30% obtenidas de una preparación de cromatina de hígado de rata a la que se añadió fracción 5. (B) Fracción 5 de adulto farato de Ceratitis capitata.



A

B

La segunda posibilidad arriba apuntada no es -- del todo desechable, aunque no se ha tratado de comprobar. Piénsese que esta proteína es constitutiva de la pared -- protectora del adulto farato, y muy bien podría estar uni da a polisacáridos, tal como ocurre en determinadas pare-- des bacterianas.

3.2.3. IDENTIFICACION DE LAS BANDAS RESTANTES

Johns y col. (1960) describieron la separación de las histonas ricas en arginina (F2A y F3) tratando la cromatina de timo de ternera con Etanol-ClH. El mismo -- procedimiento se aplicó al adulto farato de Ceratitis ca- pitata obteniéndose la imagen electroforética que aparece en la Figura 3.8A, que comparada con la correspondiente a histonas totales (parte B de la misma figura) correspon-- den a las bandas 1, 2 y 4, aunque también aparecen bandas de menor intensidad y movilidad que las anteriores, y que deben corresponder a productos de agregación de la frac-- ción F3. Cuando este preparado se sometió a condiciones de oxidación (tal como se ha descrito en el apartado 2.7.1) aparecía un precipitado en la bolsa de diálisis. El mate-- rial que permanecía soluble mostraba la casi ausencia de banda 4 (Figura 3.9B), lo que llevó a concluir que esta -- banda corresponde a la fracción F3, que precipita en la -- bolsa de diálisis a causa de la agregación producida por la presencia de la cisteína en esta molécula. El precipi-- tado dió la imagen electroforética correspondiente a la -- parte C de la Figura, donde se observan bandas de baja mo

vilidad, muchas de las cuales aparecían ya en el extracto directo de etanol-ClH. Cuando la oxidación se realizó sobre histona total, tuvo las mismas consecuencias: desaparición de la banda 4 y aparición de bandas de menor movilidad. A la vista de estos datos se hizo una asignación provisional de la banda 4 haciéndola corresponder a la fracción F3, por sus propiedades de formar agregados que demuestra la presencia de cisteína así como la de corresponder a una fracción rica en arginina.

Johns (1967) comprobó que en etanol 75%-ClGu -- 10%(p/v) se separaban selectivamente las fracciones F2A. Este método también fue aplicado a adulto farato de Ceratitis capitata, y la imagen electroforética del preparado se muestra en la Figura 3.10B, apareciendo dos bandas que corresponden en movilidad a las bandas 1 y 2 de histonas totales (parte A de la Figura). Por precipitación fraccionada con acetona se consigue la separación de ambas fracciones (Phillips y Johns, 1965). Así se consiguió la preparación de la fracción F2A1 (Perera, 1975) cuya imagen electroforética se muestra en la parte C de la figura y que corresponde a la banda 1 de histonas totales. Este resultado es perfectamente lógico, ya que según se ha comentado, la fracción F2A1 no varía en movilidad electroforética y muy poco en composición de aminoácidos a lo largo de la evolución. Se puede por tanto concluir que la banda 1 corresponde a F2A1 y la banda 2 a F2A2. La ausencia de banda 4 en estos extractos con etanol-ClGu es una prueba más de su naturaleza de fracción F3.

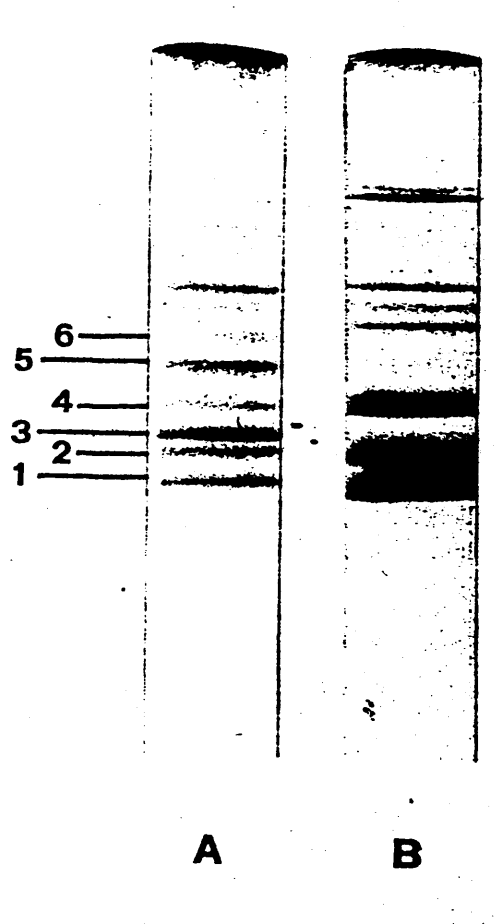


Figura 3.8.- Electroforesis en gel de poliacrilamida.

(A) Histonas totales de adulto farato de Ceratitis ca
pitata. (B) Fracciones de histonas de adulto farato de
Ceratitis capitata solubles en EtOH-ClH.

109

T A B L A 3-VI

Composición de aminoácidos de fracciones de histonas de Ceratitis capitata.

Moles por 100 moles

Aminoácido	Fracción 1 (1)	Fracción 2 (2)	Fracción 3 (3)	Fracción 4 agregada
Acido aspártico	7.7	8.5	8.0	9.6
Treonina	5.8	3.4	4.3	4.8
Serina	2.8	3.8	4.6	5.6
Acido glutámico	8.8	11.0	11.2	13.6
Prolina	3.0	1.8	5.4	6.4
Glicocola	12.4	9.3	6.5	6.4
Alanina	6.6	11.6	9.3	10.4
1/2 Cisteina	0.0	0.0	0.0	tr
Valina	7.2	7.2	8.9	4.8
Metionina	1.1	1.0	0.8	0.8
Isoleucina	5.5	4.8	4.7	4.0
Leucina	9.4	11.4	5.8	9.6
Tirosina	3.6	2.7	3.1	4.0
Fenilalanina	2.8	2.0	2.2	3.2
Lisina	8.6	10.7	13.0	7.2
Histidina	1.9	1.6	4.3	1.6
Arginina	10.8	9.2	7.8	8.0
B/A	1.3	1.1	1.3	0.7
Lys/Arg	0.8	1.1	1.7	0.9

(1) Perera, 1974.

(2) López Cano, 1974.

(3) Rojo, 1975.

La banda 3 fue identificada como fracción F2B - aplicando los métodos de fraccionamiento y dado su peculiar análisis de aminoácidos (Rojo, 1975). La imagen electroforética de esta fracción se muestra en la Figura 3.10D. En la Tabla 3-VI se recogen los análisis de aminoácidos - de las distintas fracciones obtenidas de Ceratitis capitata por los procedimientos anteriormente descritos.

3.3. PURIFICACION DE LA FRACCION F1 DE CERATITIS CAPITATA =====

Ya se ha indicado en apartados anteriores que en la extracción selectiva de F1 de adulto farato de Ceratis capitata con PCA 5%(p/v) siempre aparecía acompañada - dicha fracción con otra banda de menor movilidad electroforética e intensidad. Era por tanto conveniente intentar - su eliminación con el fin de obtener preparaciones más puras. Tras intentar sin éxito diversos procedimientos físicos de separación (cromatografía en geles, electroforesis preparativa, etc.) se recurrió a estudiar el comportamiento químico de ambas fracciones con el fin de encontrar alguna diferencia en sus solubilidades que hiciera posible - su separación. Se había observado que al precipitar con - TCA el extracto de PCA 5%(p/v) ocurría una precipitación - a una concentración inferior al 18% de TCA y este hecho hizo pensar en la posibilidad de que se tratara de esa proteína. Separado el precipitado se obtenía una imagen electroforética en la que en efecto estaba aumentada la intensidad de dicha fracción, pero ni una ni otra se consiguió separar completamente por este procedimiento.

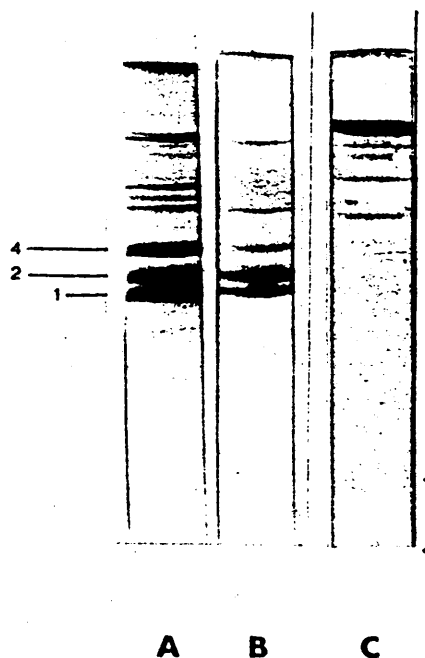


Figura 3.9.- Electroforesis en gel de poliacrilamida. (A) Fracciones solubles en EtOH-ClH. (B) Fracciones precipitadas con TCA 18% del sobrenadante de la diálisis posterior al tratamiento de oxidación. (C) Distintos agregados de la fracción correspondiente a la banda 4.

Otro procedimiento utilizado, con éxito, consistió en la extracción de cromatina cruda con concentraciones crecientes de PCA (0.7N, 1.0N, 1.5N y 2.0N). El resultado de la experiencia se muestra en la Figura 3.11A, donde se observa que a una concentración de PCA 2M se extrae exclusivamente la fracción F1 sin contaminación. Para comprobar si efectivamente se trataba de F1 (y no de banda 5) se realizó una electroforesis doble frente a histona total. Efectivamente correspondía con la fracción F1, tal como se observa en la parte B de la Figura.

En la Tabla 3-VII se muestra el análisis de esta fracción así obtenida comparada con la F1 sin purificar y con la F1 de Drosophila melanogaster. Se observan a este respecto pocas diferencias en ambas preparaciones, quizá un ligero aumento de cisteína y disminución en histidina. Por otra parte, como se puede comprobar, el análisis es característico de fracción F1, con su alto contenido en Lisina y Alanina. También es llamativo la presencia de histidina en esta preparación, concordante con Drosophila melanogaster, residuo que no aparece en la F1 de timo de ternera.

Hay que advertir que en algunas de las preparaciones efectuadas por este procedimiento (extracción con PCA 2M) aparecía una alta contaminación de banda 5. Este hecho puede ser debido a la alta concentración de PCA empleada que hace que precipite tanto la fracción F1 como la banda 5 a menores concentraciones de TCA. Pero en estos casos fue fácil la posterior purificación sin más que redissolver el preparado en PCA 5%(p/v) y posterior precipitación con TCA hasta una concentración del 18%(p/v).

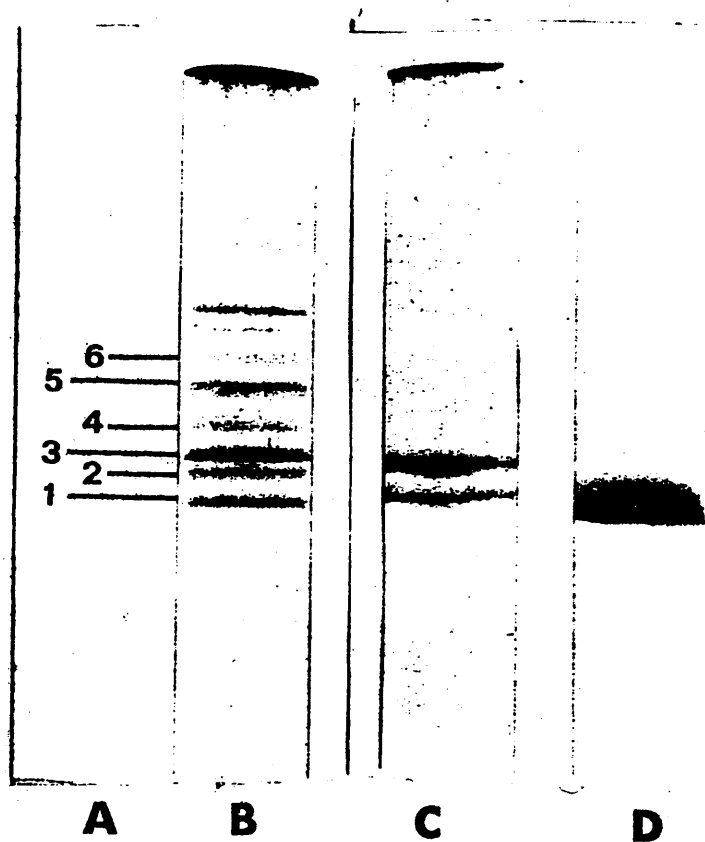


Figura 3.10.- Electroforesis en gel de poliacrilamida. (A) Histonas totales de adulto farato de Ceratitis capitata. (B) Fracciones solubles en EtOH-ClGu. (C) Fracción F2A1 (Perera, 1975). (D) Fracción correspondiente a la banda 3, separada por cromatografía en CMC (Rojo, 1974).

3.4. PROPIEDADES DE LA FRACCION F1

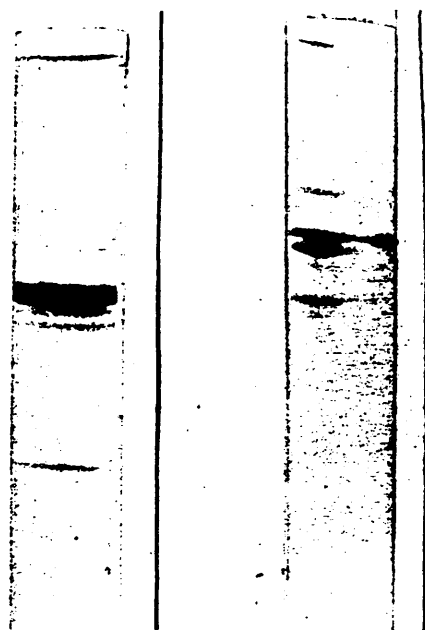
=====

3.4.1. AGREGACION DE LA FRACCION F1

Cuando las histonas totales de adulto farato de Ceratitis capitata se sometieron a condiciones de oxidación (apartado 2.7.1) se observaba la aparición de bandas de baja movilidad correspondientes a los agregados formados durante el proceso. Al principio sin embargo no se podía decidir a qué fracción correspondía dicha agregación. Fue necesaria la separación de todas las fracciones para poder comprobar este extremo. Así se vió que cuando se realizaba la oxidación sobre la fracción F1 aparecían estos agregados de baja movilidad, pudiendo concluir por tanto que la fracción F1 posee capacidad para formar tales agregados, facultad seguramente determinada por la presencia de cisteína en su molécula, ya que la presencia de ClGu excluye la posibilidad de formación de cualquier otro tipo de unión que no sea un enlace covalente por medio de puentes disulfuro. Para comprobar de forma concluyente esta hipótesis se realizaron las operaciones de agregación antes descritas pero en presencia de un agente reductor, para lo cual se añadió ditiotreitól a una concentración de 0.01M al ClGu-Tris y mercaptoetanol 0.01M al medio de diálisis. De esta forma, si la agregación era causada por formación de puentes disulfuro, en presencia de estos agentes reductores, se verían altamente impedidos. En efecto, en estos experimentos no tenía lugar --

prácticamente ninguna agregación de la fracción F1, hecho que permite concluir que este fenómeno ocurre por formación de puentes disulfuro intermoleculares. En la Figura 3.12A se muestra la imagen electroforética de una histona total oxidada y en la parte B de la Figura la fracción F1 sometida a las mismas condiciones de oxidación. Fundamentalmente aparecen dos bandas, de baja movilidad, una de las cuales prácticamente no penetra en el gel. Aproximadamente agrega el 70% de la totalidad de la fracción F1 sometida a estas condiciones. La aparición de dos bandas hace suponer la formación de dos distintos agregados de diferentes pesos moleculares, lo que podría implicar la existencia de más de un resto de cisteína por molécula de F1, lo cual está plenamente de acuerdo con la composición de aminoácidos de esta fracción.

En todos los anteriores experimentos de oxidación sobre la fracción F1, en la etapa de diálisis frente a agua aparecía un precipitado que se recogió por centrifugación y se lavó con acetona. En la Figura 3.16 se muestra la imagen electroforética de este preparado comparado con una preparación de F1. Como se puede observar en esta figura, el precipitado está formado fundamentalmente por la banda de menor movilidad que acompaña a la fracción F1 en las preparaciones efectuadas por extracción con PCA 5%. En algunos casos es casi exclusiva la presencia de esta proteína en el precipitado que aparece en la bolsa de diálisis. En la Tabla 3-VIII aparece el análisis de aminoácidos de dicha fracción, donde -

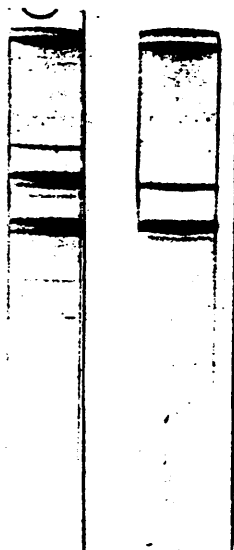


A

B

Figura 3.11.- Electroforesis en gel de poliacrilamida. (A) Proteína extraída con PCA 2M y precipitada con TCA 18% a partir de adulto farato de Ceratitis capitata. (B) Electroforesis doble de dicha fracción (derecha) frente a histona total del insecto (izquierda).

Figura 3.12.- Electroforesis en gel de poliacrilamida. (A) Histona total de adulto farato de Ceratitis capitata sometida a condiciones de oxidación. (B) Fracción F1 de adulto farato sometida a las mismas condiciones.



A

B

T A B L A 3-VIII

Composición de aminoácidos del precipitado durante la diálisis en la oxidación de Fl extraída por PCA 5%.

Aminoácido	Moles por 100 moles
	Precipitado durante la diálisis
Acido aspártico	14.8
Treonina	5.0
Serina	8.9
Acido glutámico	11.0
Prolina	7.1
Glicocola	11.0
Alanina	8.5
1/2 Cisteina	-
Valina	4.1
Metionina	0.5
Isoleucina	1.5
Leucina	2.7
Tirosina	0.8
Fenilalanina	-
Lisina	14.8
Histidina	0.6
Arginina	8.7
B/A	0.9
Lys/Arg	1.7

se observa una composición nada semejante a la habitual - de las fracciones de histonas. Parece ser, pues, que se trata de una proteína no histona. Johns y col. (1975) -- aislaron cromatográficamente una fracción contaminante de fracción F1, cuyo análisis de aminoácido no corresponde a una histona y que presenta ciertas semejanzas con el preparado aquí obtenido. Esta proteína, que acompaña a la - F1 del insecto, puede ser, pues, una proteína no histona del tipo descrito por Johns y col. (1975) cuya función -- permanece aún sin dilucidar.

3.4.2. PESO MOLECULAR DE LA FRACCION F1

Ya se destacó en apartados anteriores la baja - movilidad electroforética de esta fracción comparada con la homóloga de otras especies. Esta característica, peculiar de la fracción F1 de insectos (Dick y Johns, 1969; Pallotta y Berlowitz, 1970) puede ser atribuída tanto a - un mayor peso molecular como a una menor carga neta positiva. Según se puede observar en el análisis de aminoácidos la proporción de aminoácidos básicos es menor que en la F1 de timo de ternera. En cuanto al peso molecular se realizó su cálculo en electroforesis en SDS, tal como se describe en el apartado 2.6.4. En la Figura 3.13 se reco - gen los resultados, apareciendo un peso molecular de 22.800 ligeramente superior al peso molecular de la fracción F1 de timo de ternera, que es de 21.000. Oliver y Chalkley (1972) encuentran para la F1 de Drosophila melanogaster - un peso molecular de 23.000. Parece ser, por tanto, que

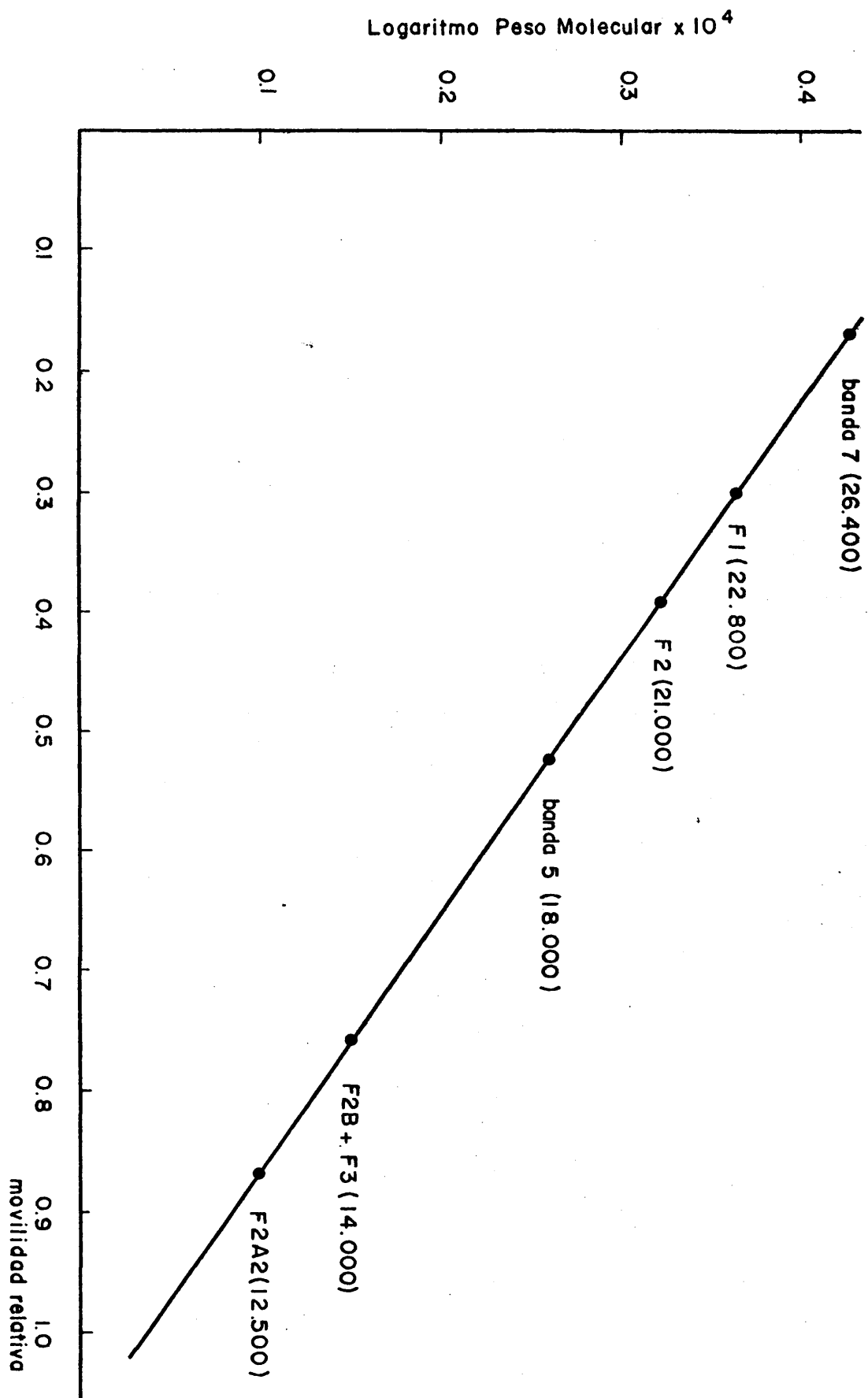


Figura 7.13. -- Determinación de pesos moleculares de algunas fracciones de histonas del díptero Ceratitis ca-
pitata por electroforesis en presencia de SDS.

tal como opinan Cohen y Gotchel (1971) la menor movilidad se debe más a la diferencia en densidad de carga que no a diferencias en peso molecular. La no subdivisión en bandas de esta fracción indica que aunque exista microheterogeneidad debe haber pocas diferencias en el tamaño molecular de las distintas subfracciones.

3.4.3. DEPENDENCIA DE LA AGREGACION CON EL TIEMPO

Con el fin de investigar la dependencia de la agregación de la fracción F1 con el tiempo de incubación en ClGu-Tris, se realizó el experimento a distintos tiempos de incubación (sin incubar, 3, 5 y 7 horas). Al cabo de los sucesivos tiempos se realizaron idénticas operaciones con todas las muestras (tal como se describe en el apartado 2.7.1). En la Figura 3.14 se muestran las imágenes electroforéticas correspondientes a los distintos tiempos y en la Figura 3.15 los densitogramas correspondientes. Aunque el cálculo de áreas de la banda próxima a la superficie del gel se hace dificultoso se observa la idéntica proporción de todas las bandas a distintos tiempos de incubación. Aproximadamente el 70% de la histona F1 se encuentra agregada y esta agregación es instantánea, no prosperando a pesar de prolongar el tiempo de incubación en presencia del agente oxidante. Este hecho lleva a concluir que la oxidación de la fracción F1 es instantánea y que existe una cierta cantidad de fracción F1 residual que no agrega a pesar de prolongar el tiempo de incubación. Este último hecho hace pensar en la posibilidad

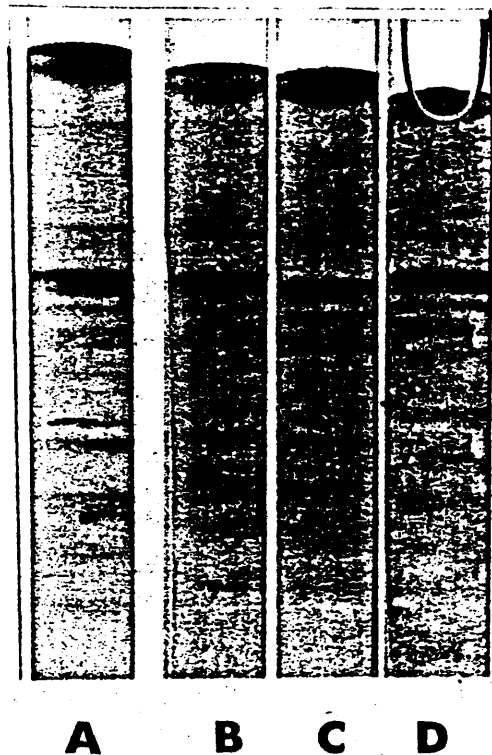


Figura 3.14..- Electroforesis en gel de poliacrilamida de Fl de adulto farato de Ceratitis capitata sometida a condiciones de oxidación a distintos tiempos de incubación: (A) Tiempo 0. (B) 3 horas. (C) 5 horas. (D) 7 horas.

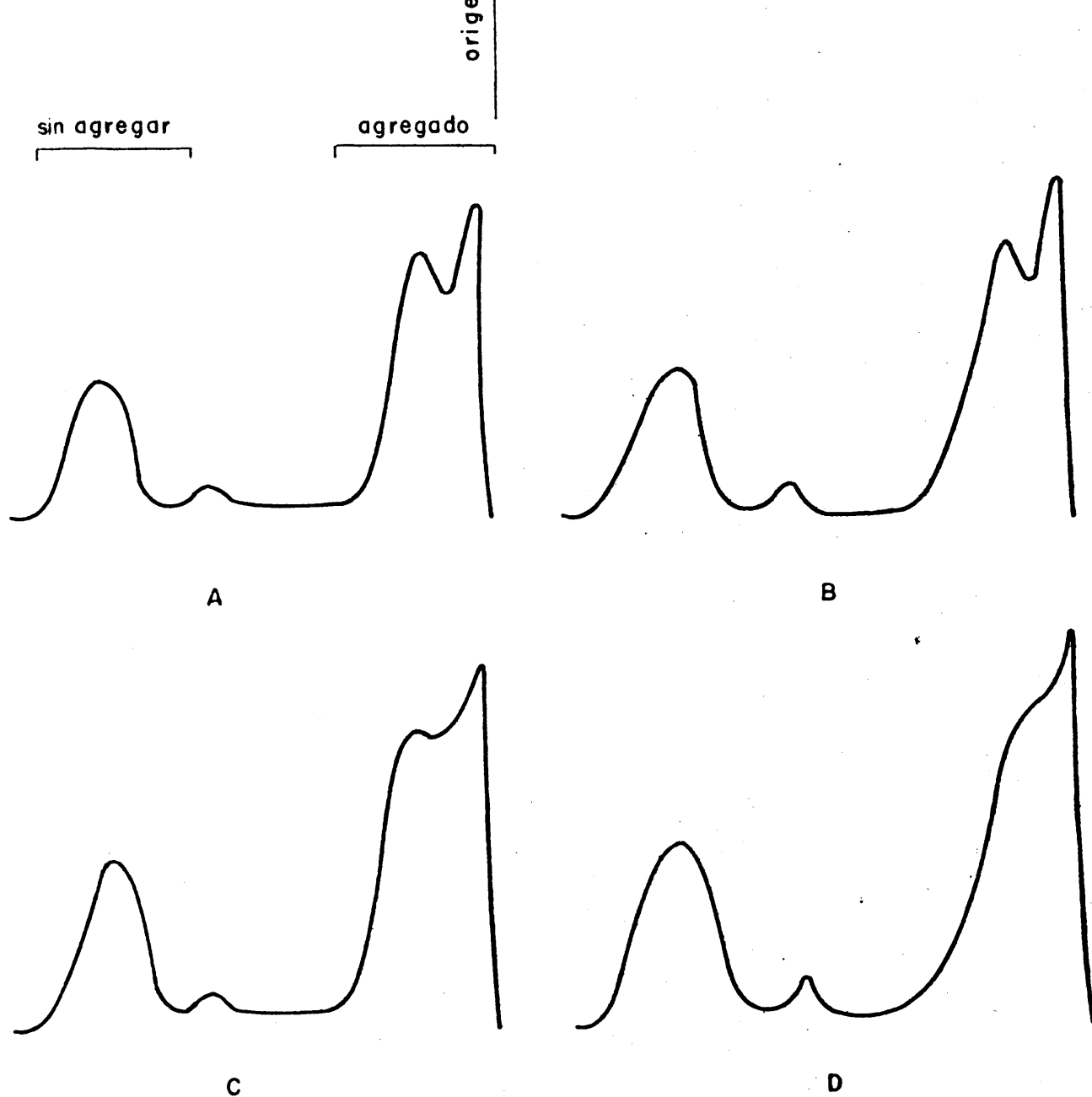


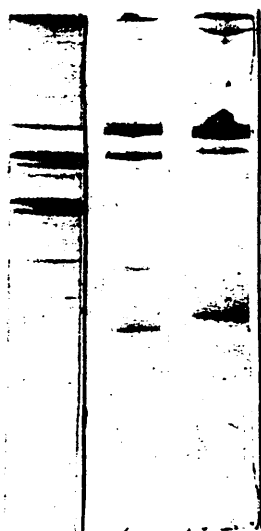
Figura 3.15.- Densitogramas de las electroforesis en gel de poliacrilamida correspondientes a distintos tiempos de incubación en ClGu-Tris de la fracción F1 de Ceratitis capitata. (A) Tiempo 0 (B) 3 horas (C) 5 horas (D) 7 horas

de dos distintas especies moleculares componentes de esta fracción, una con cisteína, y por tanto posible de agregar en estas condiciones, y otra carente de este residuo y que por tanto no es posible que forme agregados en condiciones de oxidación. Para confirmar esta hipótesis se hacía necesaria la separación de ambas especies, agregada y sin agregar.

3.4.4. SEPARACION DE LAS ESPECIES MOLECULARES DE F1 AGREGADA Y SIN AGREGAR

El primer intento de separación se llevó a cabo por electroforesis preparativa tal como se describe en el apartado 2.6.2. En la Figura 3.17 se muestran las imágenes electroforéticas de las distintas fracciones recogidas, observándose la perfecta separación de la F1 sin -- agregar. En cambio la F1 agregada aparecía contaminada y no fue posible aislarla completamente pura por este procedimiento.

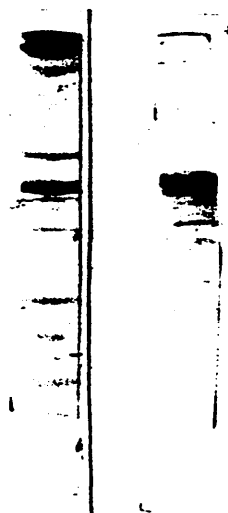
Por el contrario, al realizar la cromatografía en Biogel P-100, descrita en el apartado 2.6.2, se consiguió la perfecta separación de dos distintas subfracciones de agregado, aunque la F1 sin agregar era la que aparecía en este caso ligeramente contaminada. En la Figura 3.18 se muestra el perfil de elución de esta cromatografía y en la Figura 3.19 las imágenes electroforéticas de los picos correspondientes.



A B C

Figura 3.16..- Electroforesis en gel de poliacrilamida. (A) Histona total de Ceratititis capitata. (B) y (C) Precipitados durante la diálisis frente a agua destilada en el proceso de oxidación de la fracción Fl.

Figura 3.17..- Separación por electroforesis preparativa de la subfracción de Fl que no agrega durante el proceso de oxidación. (A) Muestra aplicada a la electroforesis preparativa. (B) Subfracción de Fl sin agregar.



A B

Cuando la fracción sin agregar pura, obtenida - por electroforesis preparativa, se sometió a las mismas - condiciones de oxidación descritas previamente se observó que aun extremando las condiciones (24 horas de incubación) no se producían agregados, hecho que junto con el resultado del estudio de la dependencia de la agregación de F1 - con el tiempo de incubación hace concluir que se trata de una subfracción incapaz de formar agregados en estas condiciones, y, como consecuencia, de alguna forma de distinta naturaleza molecular.

En la Tabla 3-IX se muestran los análisis de -- aminoácidos de las tres subfracciones puras, las dos de -- agregados obtenidas por cromatografía y la subfracción -- sin agregar obtenida por electroforesis preparativa. A -- la vista de estos análisis de aminoácidos se pueden obtener varias conclusiones. En primer lugar se observa la -- presencia de pequeñas proporciones de cisteína únicamente en las fracciones agrupadas, lo que está completamente de acuerdo con toda la discusión precedente, ya que es precisamente la presencia de este residuo la responsable de la agregación. Sin embargo el que no aparezca en cantidades apreciables en el análisis de aminoácidos no es de extrañar, ya que este residuo se oxida muy fácilmente a ácido cisteico durante el proceso de hidrólisis, a pesar de hacer en los tubos de hidrólisis el vacío, y la detección -- de este ácido está sujeta a un considerable error, dada -- la baja sensibilidad de su reacción con ninhidrina.

Por otra parte no se observa ninguna otra diferencia peculiar entre cada una de las subfracciones de F1.

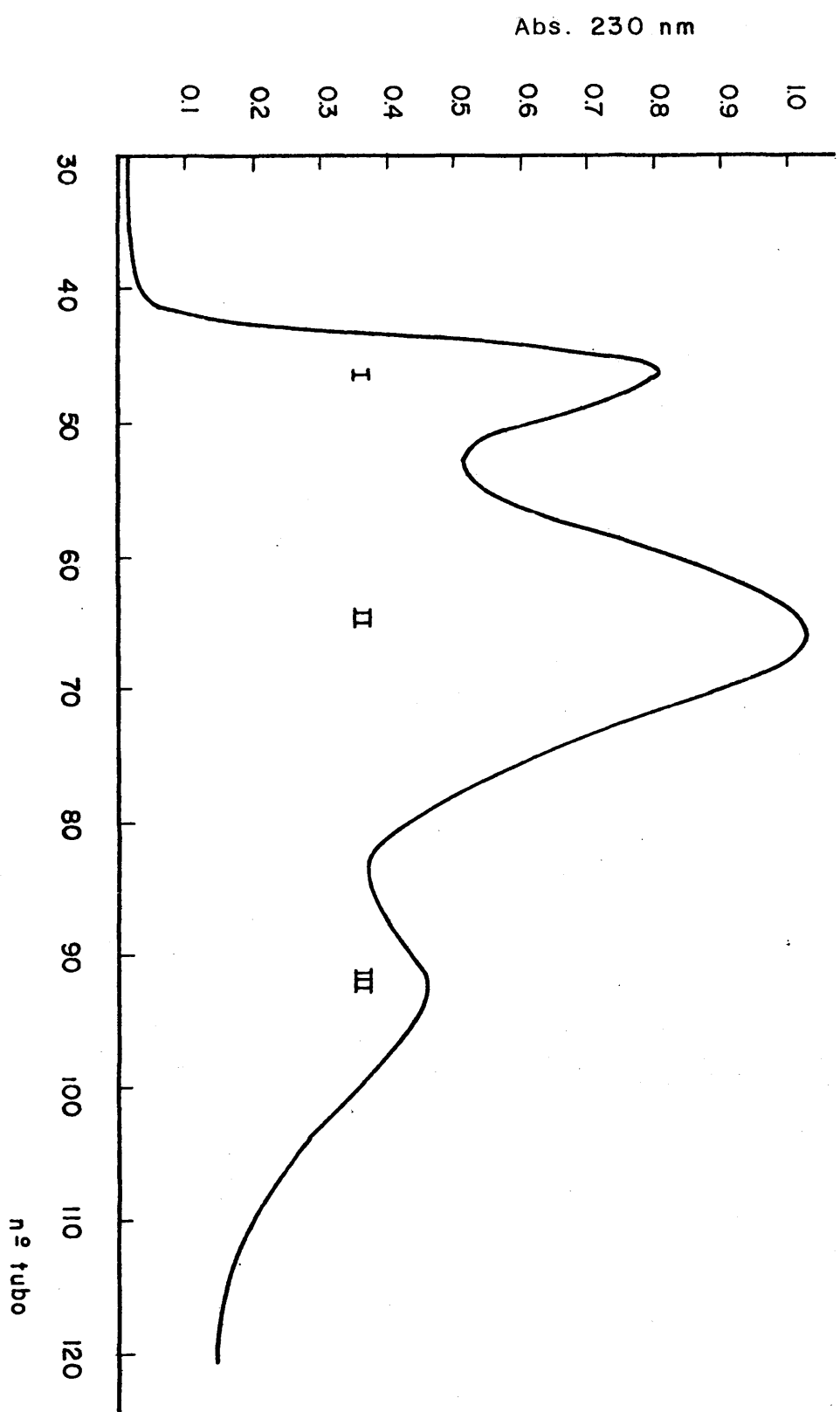


Figura 3.18 .- Cromatografía en columna de Biogel P-100 de fracción F1 agregada de Ceratitis capitata.

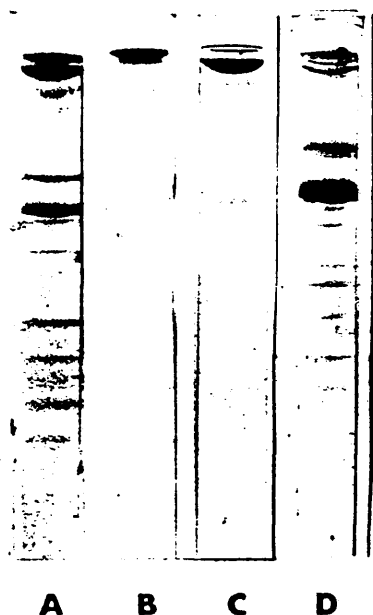
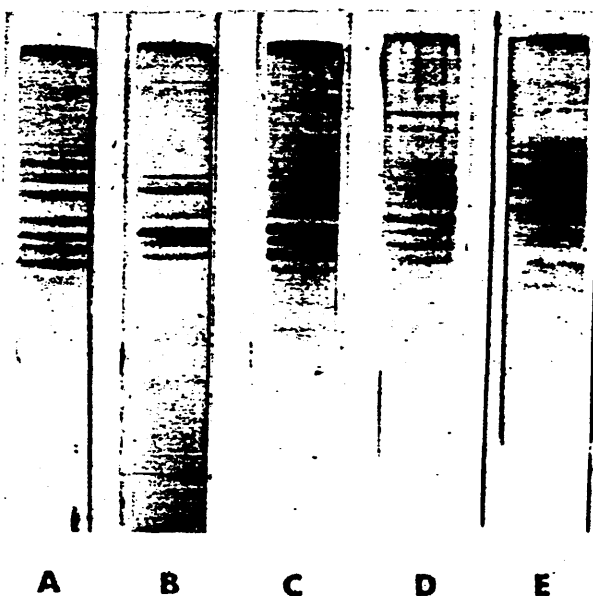


Figura 3.19.- Electroforesis en gel de poliacrilamida de los picos cromatográficos resultantes de la cromatografía en Biogel P-100 de Fl(agregada y sin agregar) de Ceratitis capitata. (A) Muestra aplicada a la cromatografía. (B) Pico I. (C) Pico II. (D) Pico III.

Figura 3.20.- Electroforesis en gel de poliacrilamida de la extracción selectiva con distintas concentraciones de ClNa sobre cromatina bruta de adulto farato de Ceratitis capitata. (A) ClNa 0.35 M (B) ClNa 0.50 M (C) ClNa 0.75 M (D) ClNa 1.00 M (E) Extracción sobre el residuo con ClH 0.25 N.



T A B L A 3-IX

Composición de aminoácidos de las distintas subfrac-
ciones de F1 de adulto farato de Ceratitis capitata.

Moles por 100 moles

Aminoácido	Fracción sin agre- gar (electrofore- sis preparativa)	Pico 1 cro- matografía en P-100	Pico 2 croma- tografía en P-100
Acido aspártico	5.3	4.5	4.4
Treonina	6.7	6.6	6.9
Serina	10.1	9.7	11.0
Acido glutámico	6.4	5.4	5.5
Prolina	5.7	5.5	5.4
Glicocola	7.3	7.3	7.3
Alanina	17.9	16.5	20.5
1/2 Cisteina	-	0.3	0.3
Valina	6.4	6.2	6.6
Metionina	0.6	0.7	0.5
Isoleucina	2.9	2.9	2.9
Leucina	4.3	3.9	4.0
Tirosina	1.6	1.8	1.6
Fenilalanina	1.3	1.6	1.2
Lisina	19.8	25.0	19.0
Histidina	1.0	0.7	0.7
Arginina	2.4	1.6	1.5
B/A	1.93	2.75	2.21
Lys/Arg	8.25	15.6	13.13

Todas tienen composiciones propias de histona F1, como es el alto contenido en Lisina y alanina. Quizá la diferencia más acusada sea la distinta proporción B/A, y el contenido en alanina.

Según se discutió extensamente en Parte Teórica la fracción F1 de histonas presenta microheterogeneidad en la mayoría de los materiales observados. La particularidad de la microheterogeneidad existente en la fracción F1 de Ceratitis capitata consiste en la presencia de cisteína en algunas de sus subfracciones, lo que hace posible su agregación y ulterior separación.

Sería interesante llegar a saber si el estado de agregación de estas posibles subfracciones de F1 tienen repercusiones "in vivo". No es deseable a priori la posibilidad de que tal fenómeno ocurra. Lo que sí está a un alcance inmediato es tratar de conocer las repercusiones estructurales y de comportamiento físico que tal agregación opera sobre la estructura y estabilidad térmica -- del DNA.

3.5. ESTUDIO DE LA INTERACCION F1-DNA

=====

3.5.1. INFLUENCIA DE LA FUERZA IONICA DEL MEDIO EN LA DISOCIACION DNA-HISTONAS

Uno de los métodos empleados para separar las -

distintas fracciones de histona se basa en la utilización de fuerzas iónicas crecientes actuando sobre la cromatina. Este método, aunque utilizado en principio con fin preparativo por algunos autores, no permite una adecuada resolución de las histonas, pero es sin embargo útil, tal como se discutió en Parte Teórica, para enjuiciar la naturaleza de las interacciones entre el DNA y las distintas fracciones de histona. Cuanto mayor sea la interacción electrostática existente entre ambas especies moleculares mayor ha de ser la fuerza iónica necesaria para destruir esa interacción.

En la Figura 3.20 se muestran las imágenes electroforéticas de las sucesivas extracciones salinas de cromatina cruda de Ceratitis capitata tal como se describió en el apartado 2.7.2. Como se puede observar ya a bajas fuerzas iónicas (ClNa 0.35M) se separan abundantemente todas las fracciones de histonas, si bien hay que aclarar que se obtuvo un bajo rendimiento y fue necesario aplicar en la electroforesis una alta concentración de esta extracción para que se pudieran apreciar las bandas. A concentraciones de ClNa 0.50M se separan mayoritariamente las fracciones F1 y F2B, correspondientes a la banda 3, tal como se puede observar en la parte 3 de la figura. La banda 4, correspondiente a la fracción F3 solamente se separa sin embargo de forma total a concentraciones de ClNa 1.0M. La fracción correspondiente a la banda 5 permanece unida incluso a fuerzas iónicas altas y se separa casi completamente cuando se extrae con ClH 0.25N sobre el residuo de la última extracción salina.

No deja por tanto de ser anormal la prematura - separación de todas las fracciones. Existe sin embargo - una razón lógica para explicar el general desplazamiento de la disociación salina hacia bajas concentraciones. Como se ha dicho la fracción correspondiente a la banda 5 - permanece unida al DNA incluso a altas fuerzas iónicas. Esto es lógico si se considera la alta proporción de residuos básicos de esta proteína. Pero al mismo tiempo no - es una proteína nuclear, y por tanto es posible que actúe competitivamente en su unión al DNA con las otras fracciones, desplazando el equilibrio. Podría producir un efecto similar a las protaminas, utilizadas por algunos autores para separar fracciones de histona (Van der Westhuy--zen y van Holt, 1975).

3.5.2. EXPERIMENTOS DE PRECIPITACION DEL DNA POR F1

Los experimentos de precipitación se realizaron tal como se indicó en el apartado 2.7.1 con F1 agregada y sin agregar sobre DNA de timo de ternera y de Ceratitis - capitata, comparando los resultados con las curvas de precipitación correspondientes a F1 de timo de ternera.

En la Figura 3.21 se compara la precipitación - del DNA de timo de ternera y DNA de Ceratitis capitata por F1 de Ceratitis capitata. Se observa que la precipitación tiene lugar a menores concentraciones de F1 con el DNA de timo de ternera. Este hecho sin embargo no es significativativo, ya que existe una diferente distribución de pesos -

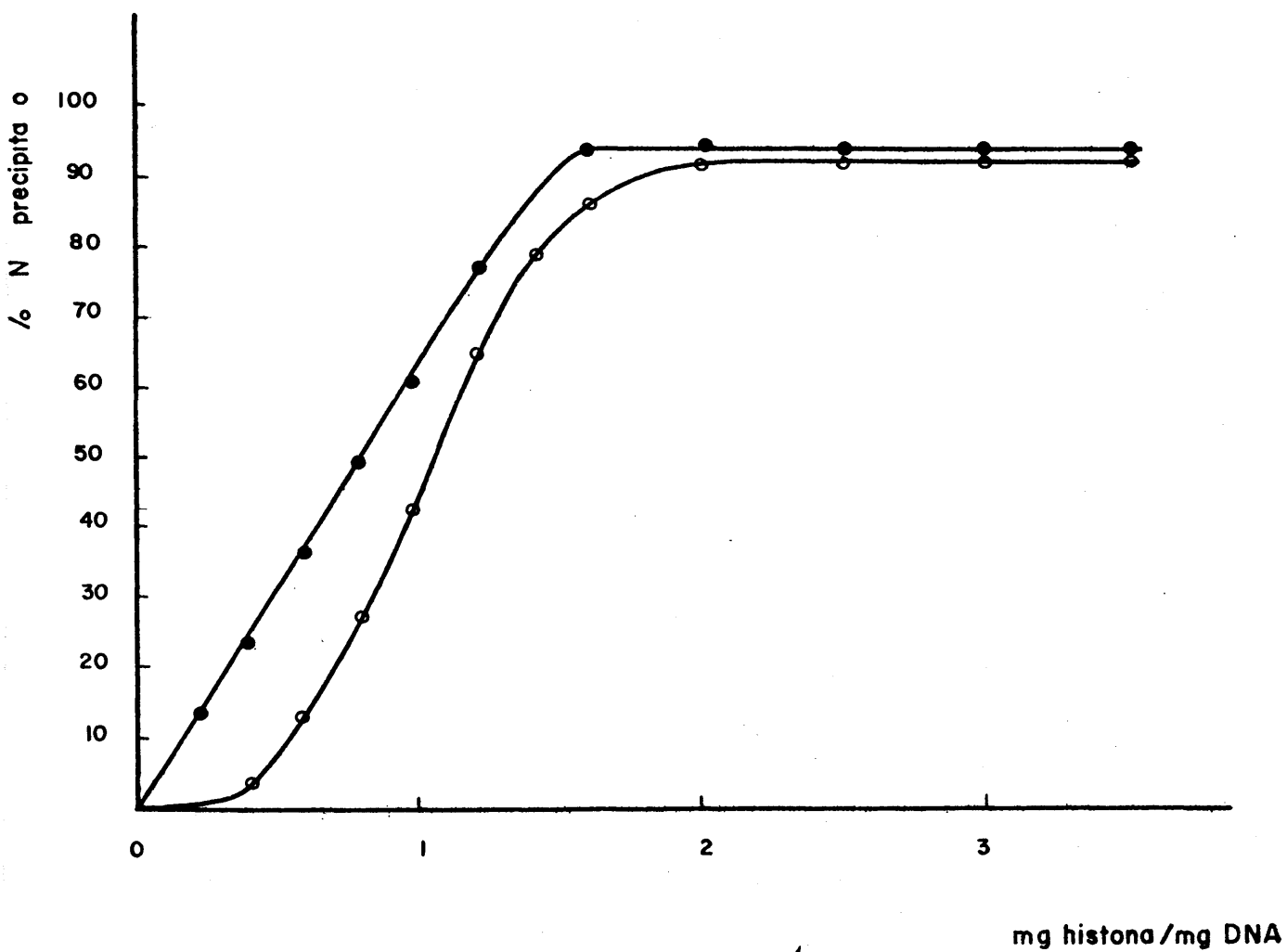


Figura 3.21.- Curvas de precipitación de DNA de timo de ternera (●) y DNA de Ceratititis capitata (○) con fracción F1 de Ceratititis capitata.

moleculares en ambas preparaciones de DNA, tal como se observa en la Figura 3.22, donde el DNA de Ceratitidis capitata aparece más degradado. Idéntico efecto se observa al utilizar F1 de timo de ternera, tal como se muestra en la Figura 3.23, donde también el DNA de timo de ternera es precipitado en su totalidad a menores relaciones F1/DNA. El hecho que sí es significativo es la menor capacidad precipitante de F1 de Ceratitidis capitata con respecto a la fracción homóloga de timo de ternera. En efecto, mientras que la F1 de timo de ternera precipita totalmente el DNA homólogo a una relación histona/DNA de 1.1 (Figura 3.23), la histona F1 de Ceratitidis capitata solo lo hace a relaciones superiores a 1.5 (Figura 3.21). Esta menor capacidad precipitante es concordante con la menor carga neta positiva de dicha fracción en el insecto, teniendo en cuenta que las interacciones electrostáticas han de ser determinantes en la energía libre de la asociación. Sin embargo es posible pensar que la diferente carga neta no es la única razón ya que puede pensarse en la intervención de fuerzas no covalentes en la asociación o bien en una distinta conformación que desfavorezca la interacción, ya que como discuten Bradbury y Stephens (1967) la mayor proporción de cadena extendida en la fracción F1 facilita la agregación de distintas cadenas de DNA con respecto a otras fracciones que tienen mayor proporción de hélice en su estructura.

Los experimentos de precipitación también se realizaron con F1 después de ser sometida a agregación. Los resultados correspondientes se muestran en la Figura 3.24:

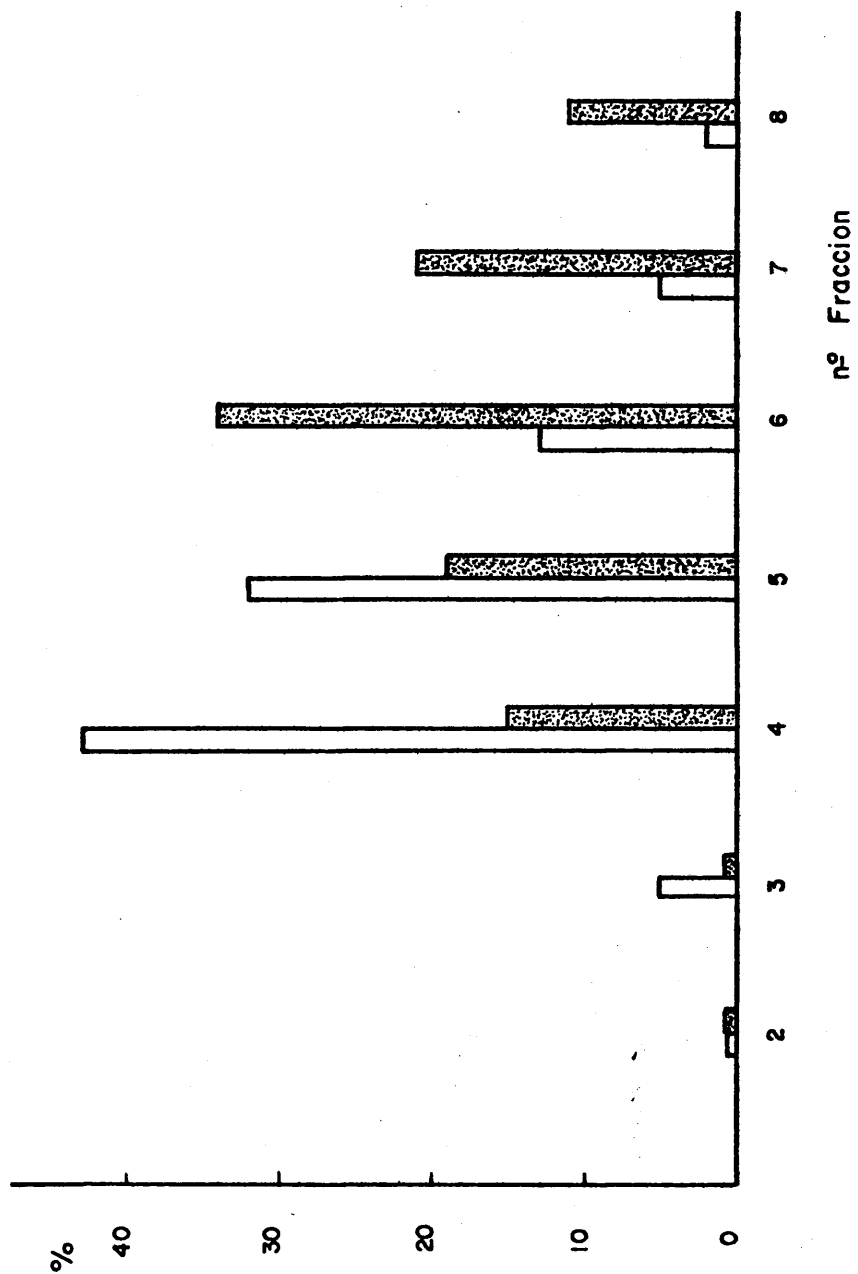


Figura 3.22 .- Distribución de tamaños moleculares de DNA de timo de ternera (□) y DNA de *Ceratitis capitata* (▨) obtenida por cromatografía en DEAE-celulosa.

la F1 utilizada después de la agregación fue F1 total, es decir, sin separar ambas especies moleculares, agregada y sin agregar. Con ello las diferencias observadas se deberán exclusivamente al fenómeno de agregación, y no a la distinta naturaleza molecular de las preparaciones utilizadas. Se observa en la figura la mayor capacidad precipitante de la F1 agregada. Este hecho es perfectamente lógico ya que a la misma concentración en peso de F1, como consecuencia de la agregación existe la posibilidad de que una única "unidad" molecular asocie mayor número de moléculas de DNA, y como consecuencia precipite antes. -- Bradbury (1970) discute la posibilidad de formación de -- agregados a diversas fuerzas iónicas. En la formación de estos agregados estarían implicadas zonas de --hélice, -- mientras que las zonas de cadena estadística, de más fácil interacción con el DNA debido tanto a su conformación como a su mayor densidad de carga positiva, quedarían libres. La fracción F1 experimenta un gran cambio conformacional como consecuencia de la fuerza iónica. Bradbury atribuye la mayor capacidad precipitante de la fracción F1 precisamente a este efecto. Es posible por tanto que en el presente caso se de una situación similar. Si bien al autoagregarse las moléculas en dímeros, trímeros o tetrameros a la misma concentración en peso decrece la probabilidad estadística de colisión con moléculas de DNA, aumenta en cambio la posibilidad de que una misma entidad molecular asocie a un mayor número de moléculas de DNA, -- produciendo por tanto la precipitación a menores concentraciones.

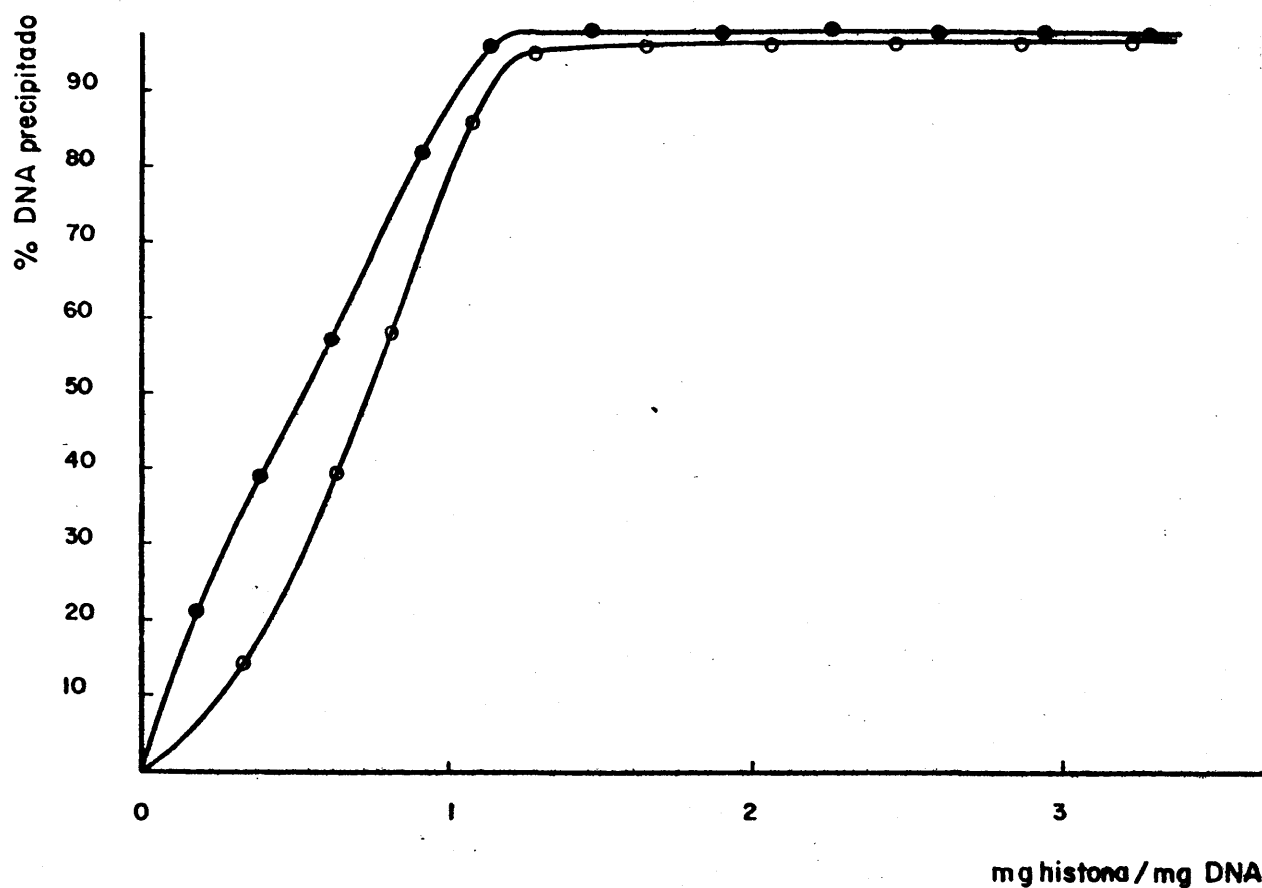


Figura 3.23..- Curvas de precipitación de DNA de timo de ternera (●) y DNA de Ceratititis capitata (○) con fracción F1 de timo de ternera.

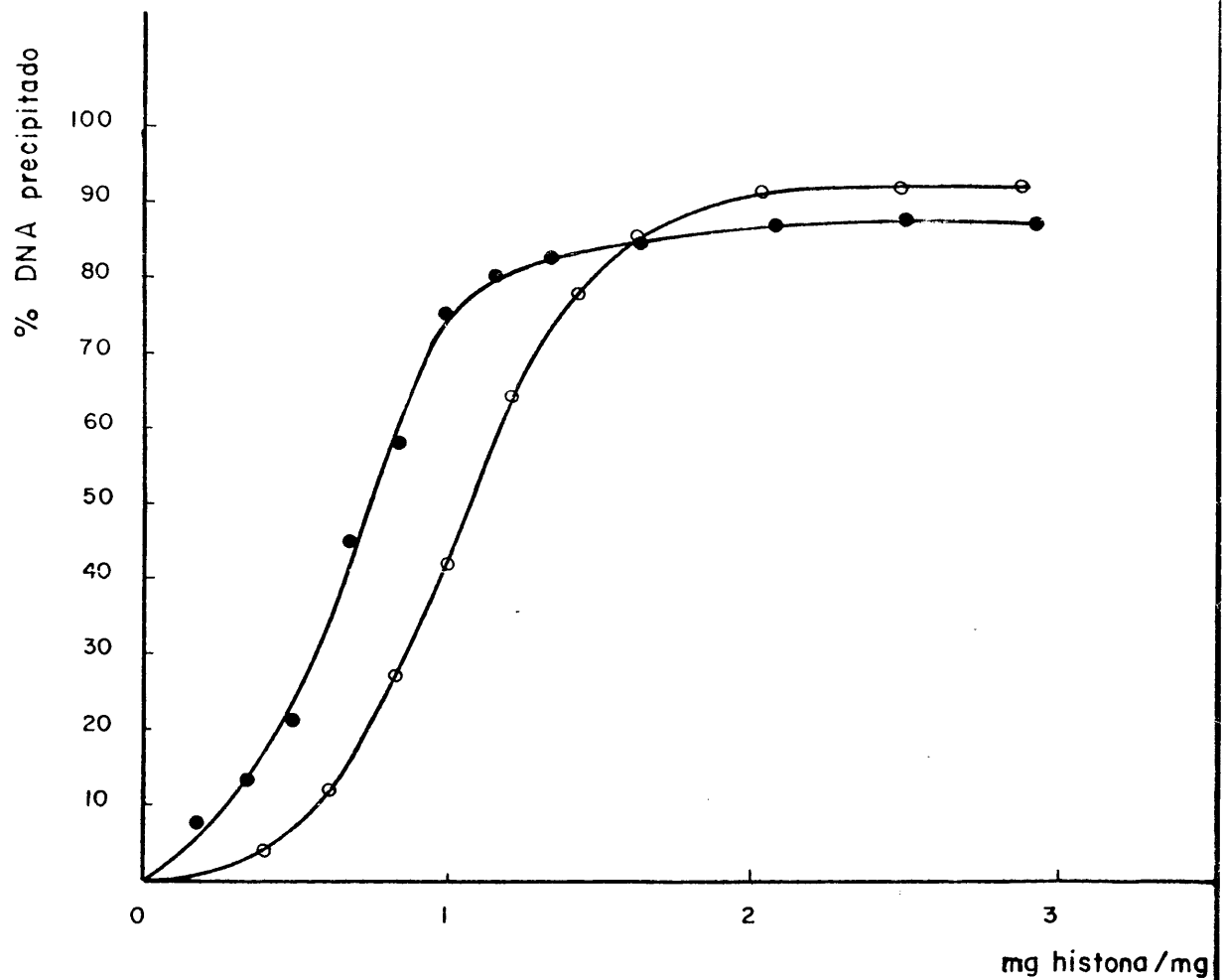


Figura 3.24.- Curvas de precipitación de DNA de Ceratitidis capitata con Fl de Ceratitidis capitata sin agregar (o) y agregad

Tal como se discutió en la sección 1.5, la frac
ción F1 de histona fundamentalmente produce entrecruza--
mientos entre distintas moléculas de DNA (Sluyser y Sne-
llen-Jurgens, 1970), a diferencia de las restantes frac-
ciones que están implicadas en la formación de estructu-
ras superhelicoidales en el DNA. Estos entrecruzamientos
pueden estar relacionados con el paso de cromatina densa
a cromatina difusa donde lo único que varía es el estado
de agregación pero no la estructura secundaria ni tercia
ria del DNA. La facilidad de esta capacidad de entrecru-
zamiento es consecuencia más de la peculiar conformación
que adquiere esta proteína que de su propia capacidad de
interacción con el DNA. Recuérdese que la F1 es la que -
tiene menos proporción de residuos básicos, aunque no --
hay que descartar la posibilidad de participación de otro
tipo de interacciones distintas de las puramente electros
táticas. En este contexto la agregación de F1 de insec-
tos da una mayor capacidad de entrecruzamiento. Sin em-
bargo no se puede juzgar con los datos precedentes hasta
qué punto este fenómeno tiene importancia real "in vivo",
aunque no es deseable la hipótesis de que este mecanis-
mo, característico de la fracción F1 de histonas de insec-
tos tenga su repercusión en determinadas peculiaridades -
morfológicas de los cromosomas politécnicos de insectos.

3.5.3. ESTUDIO SOBRE LOS COMPLEJOS F1-DNA

Se formaron complejos de histona-DNA tal como -
se describió en el apartado 2.7.3 utilizando F1 de Cerati-

tis capitata agregada y sin agregar y F1 de timo de ternera con el objeto de comparar los resultados. En todos -- los casos se utilizó DNA de timo de ternera por tener unas características moleculares ampliamente descritas en la -- bibliografía. Los complejos se formaron a tres proporcio -- nes distintas de histona/DNA (1.5, 1.0 y 0.5 p/p). Hay -- que advertir que la F1 agregada de Ceratitis capitata uti -- lizada fue mezcla de ambas especies moleculares, agregada y sin agregar, o lo que es lo mismo, la preparación direc -- tamente obtenida después de un tratamiento de oxidación -- sobre la fracción F1 obtenida por extracción con PCA 2M, tal como se describió y comentó en apartados anteriores. Tiene como fin el utilizar la mezcla de ambas especies mo -- leculares sin separar el poder estudiar exclusivamente el efecto que la agregación puede tener sobre determinadas -- características estructurales y físicas del DNA. Sobre -- estos complejos así formados se realizaron espectros de -- CD y curvas de transición térmica.

En las Figuras 3.25, 3.26 y 3.27 se muestran -- los espectros de CD, realizados tal como se especificó en el apartado 2.7.4, de estos complejos a sus distintas re -- laciones histona/DNA. La zona del espectro barrido fue -- desde 300 nm hasta 210 nm. Sin embargo en las figuras -- únicamente se recoge la zona entre 300 y 230 nm, debido a que es en esta zona donde únicamente tiene actividad ópti -- ca el DNA y no la proteína. A longitudes de onda inferio -- res no es posible distinguir a cuáles de las dos especies moleculares que componen el complejo (DNA e histonas) co -- rresponde el cambio de elipticidad, ya que a esas longitu

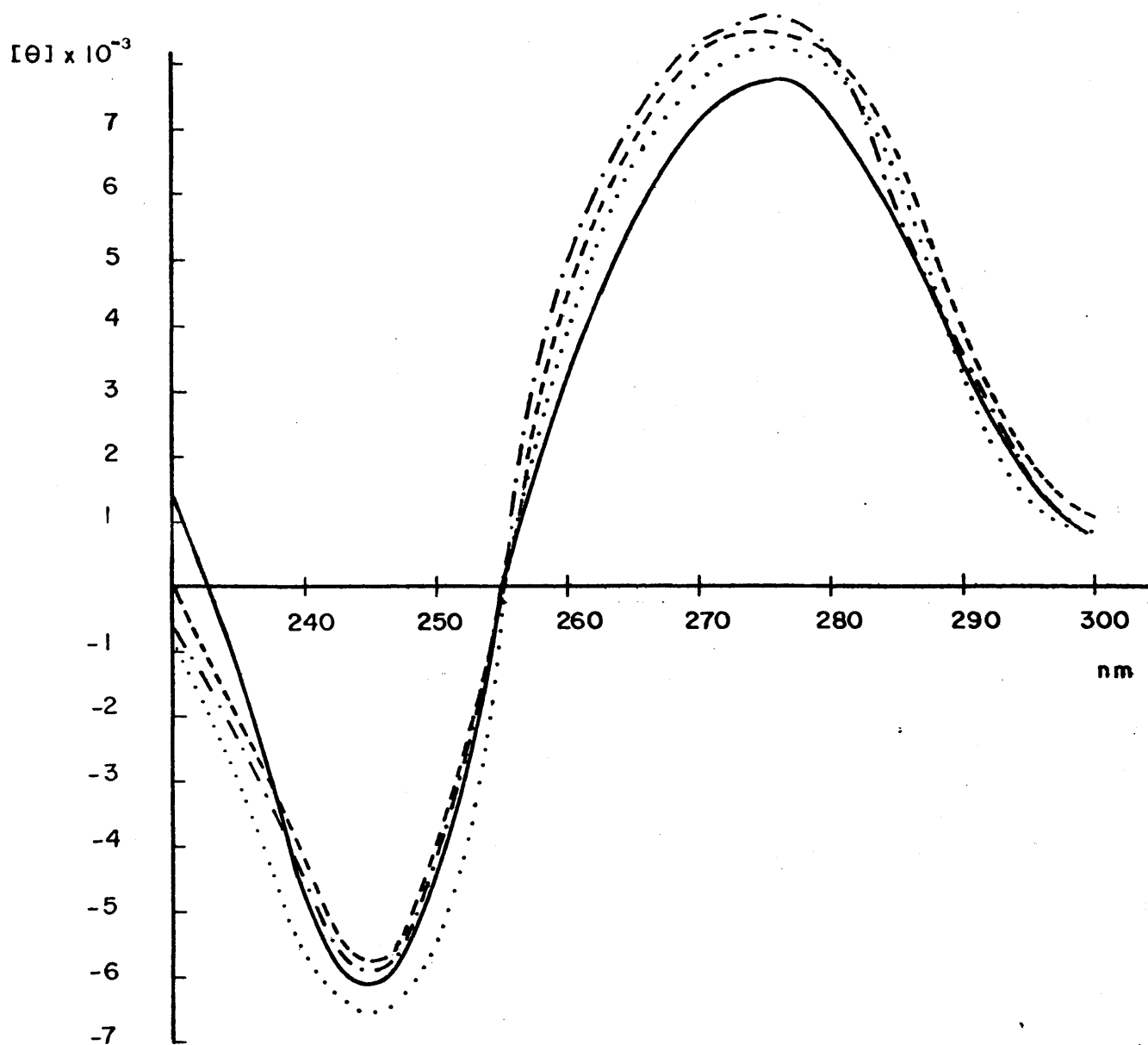


Figura 3.25..- CD de los complejos DNA-F1 de timo de ternera. (—). DNA control; (-.-) histona/DNA 1.5; (···) histona/DNA 1.0; (---) histona/DNA 0.5

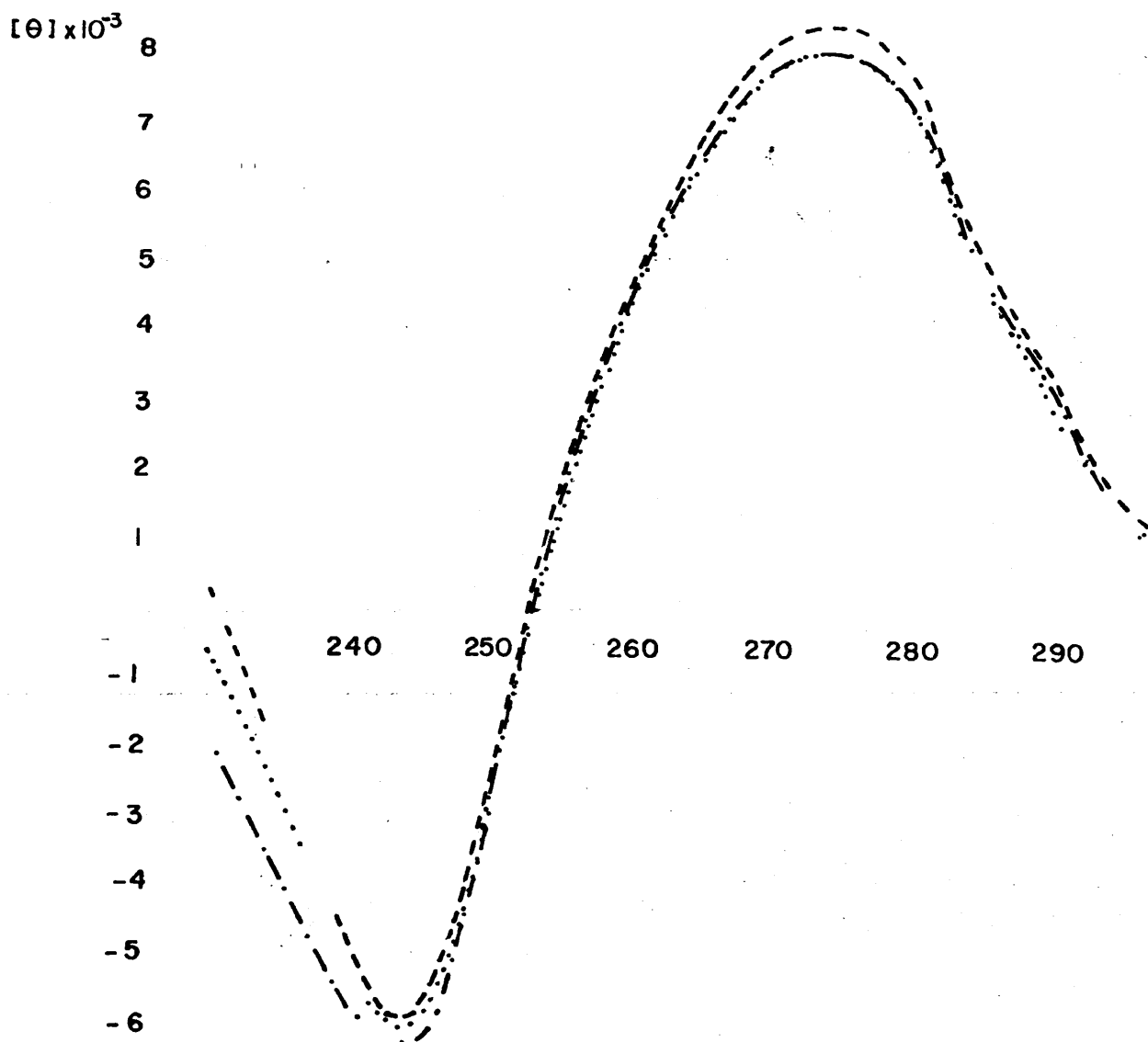


Figura 3.26.-- CD de los complejos DNA-F1 de Ceratitidis capitata agregar. (—) DNA control; (---) histona/DNA 1.5; (···) histona/DNA 1.0; (- - -) histona/DNA 0.5

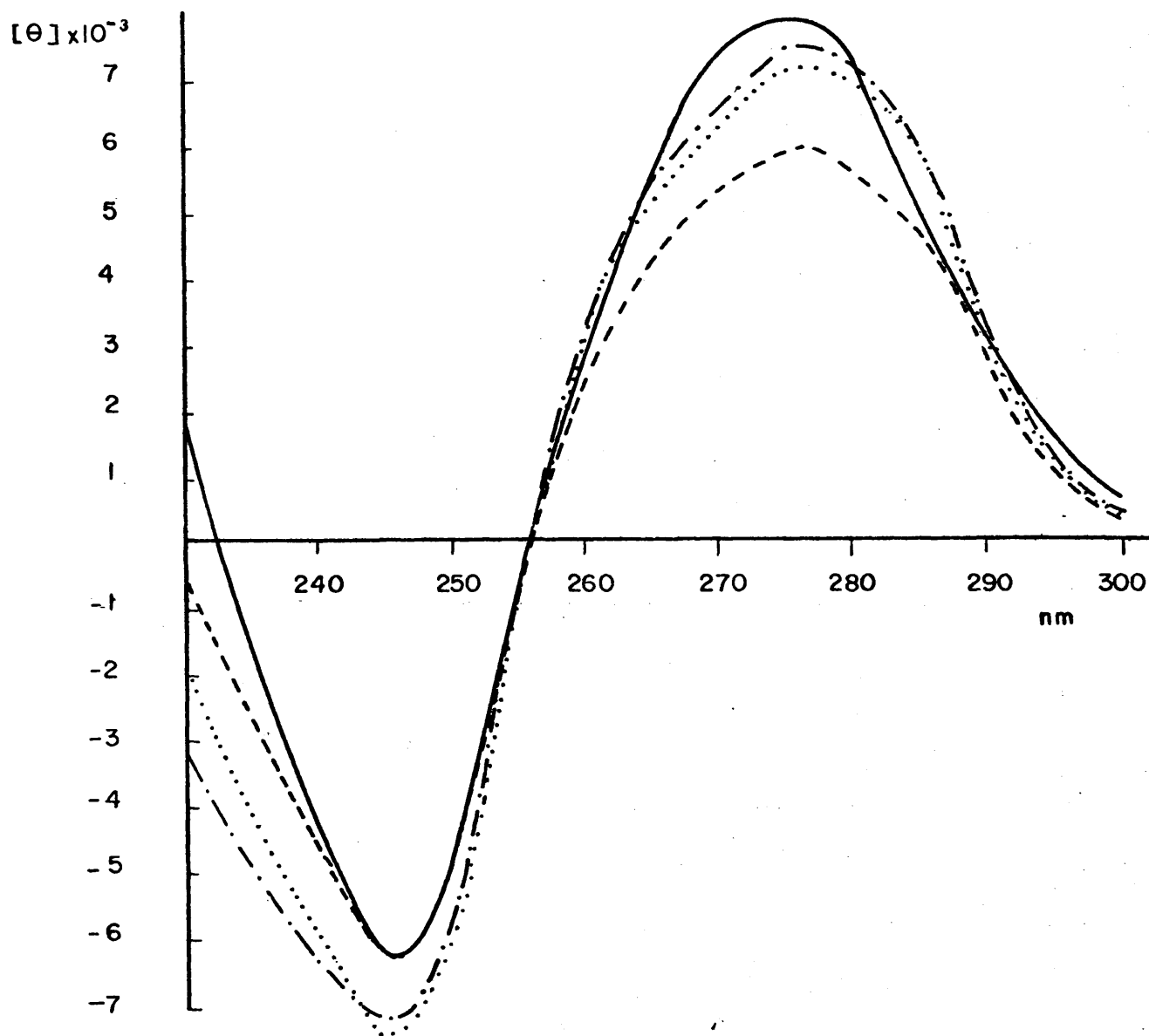


Figura 3.27.- CD de los complejos DNA-F1 de Ceratititis capitata agreda. (—) DNA control; (-·-) histona/DNA 1.5; (···) histona/DNA 1.0; (---) histona/DNA 0.5

T A B L A 3-X

Valores de elipticidad máxima y mínima de los diferentes complejos DNA-Fl.

Histona	hist/DNA (mg/mg)	λ^+_{max}	$\theta^+_{max}/10^3$	λ^-_{max}	$\theta^-_{max}/10^3$	$\theta(+)$
DNA control	-	277	7.82	245	6.10	1.
Fl timo de ternera	1.5	276	8.70	245	5.89	1.
"	1.0	276	8.31	245	6.50	1.
"	0.5	277	8.54	246	5.82	1.
Fl <u>Cerati-</u> <u>tis capi-</u> <u>tata sin</u> agregar	1.5	276	8.08	245	6.14	1.
"	1.0	276	8.08	245	5.84	1.
"	0.5	276	8.30	245	5.55	1.
Fl <u>Cerati-</u> <u>tis capita-</u> <u>ta</u> agregada	1.5	276	7.38	246	7.38	1.
"	1.0	277	7.19	246	7.42	0.
"	0.5	277	5.81	246	6.41	0.

des de onda las proteínas son también ópticamente activas. En ninguno de los casos se observaron variaciones realmente significativas con respecto al espectro de DNA sin asociar. Únicamente se observaron ligeras variaciones en la relación $\theta_{\text{max}} / \theta_{\text{mín}}$ tal como se puede ver en la Tabla 3-X. También existe una disminución de elipticidad aproximadamente del 30% en el complejo F1 agregada-DNA a la relación 0.5, pero este hecho es difícil de interpretar puesto que implicaría una modificación de la estructura del DNA a bajas concentraciones de F1 agregada.

Todo esto se debe interpretar en términos de la permanencia de la estructura B del DNA incluso después de la asociación con F1, hecho perfectamente concordante con los datos existentes en la bibliografía, ya que si bien las otras fracciones de histonas provocan una disminución de la elipticidad de alrededor del 30% y un ligero desplazamiento hacia el rojo con un desdoblamiento de la banda, la fracción F1 de otros materiales biológicos no parece alterar la estructura secundaria del DNA (Simpson y Sober, 1970; Matsuyama y col., 1971).

En cambio lo que sí resulta claramente alterado es la estabilidad térmica del DNA como consecuencia de la asociación. En la Figura 3.28 aparecen las curvas de transición térmica, realizadas tal como se indicó en el apartado 2.7.5, de los complejos DNA-F1 de timo de ternera. También se adjunta la curva de desnaturalización térmica de un DNA control, sometido a las mismas manipulaciones que el correspondiente a las formaciones de los com--

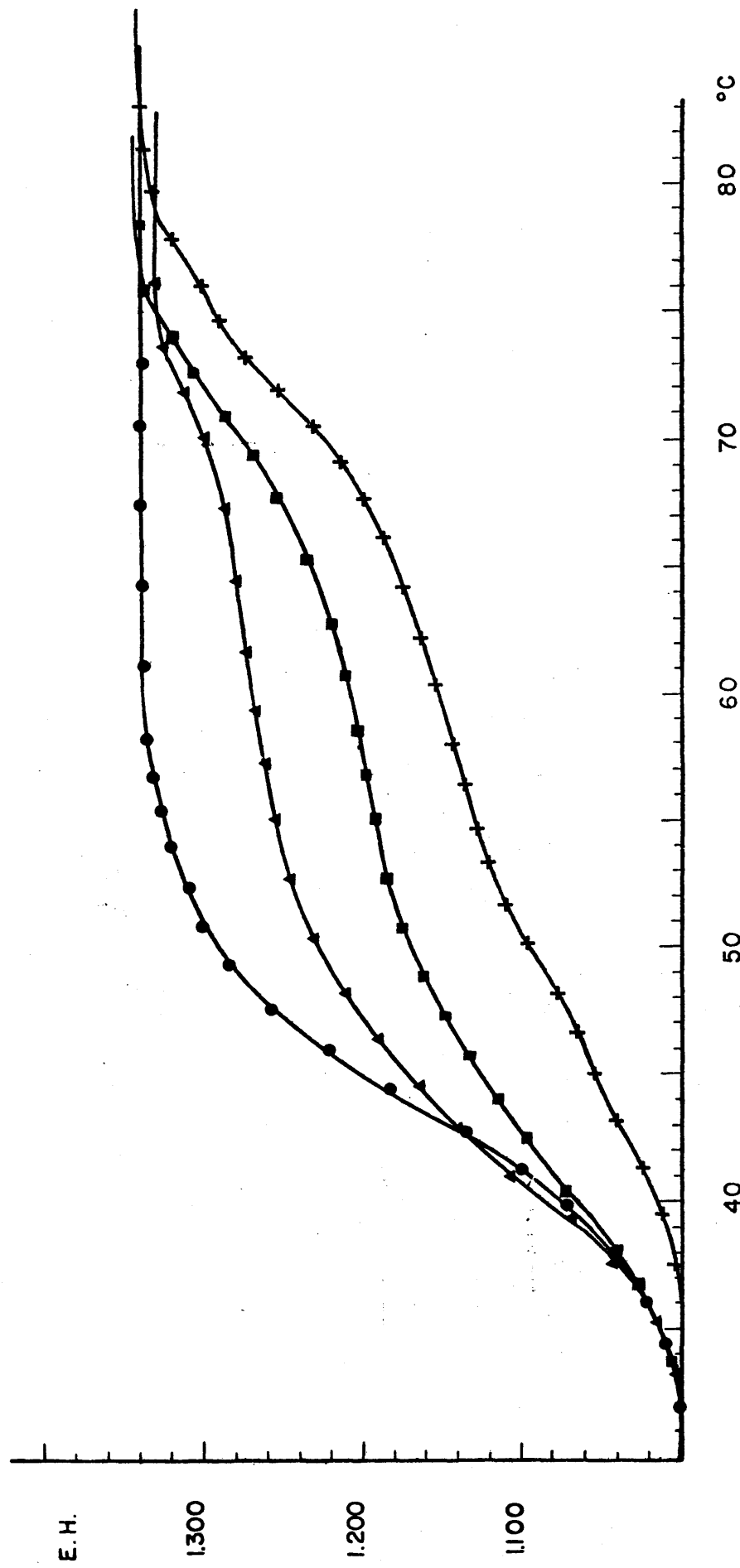


Figura 3.28..- Curvas de transición de los complejos DNA-F1 de timo de ternera. (●) DNA control; (■) histonas/DNA 1.5; (▲) histona DNA 0.5; (×) histonas/DNA 1.0

plejos pero donde la disolución de histonas se substituyó por el mismo volumen de disolvente. Este DNA se reconstituyó de forma prácticamente total, y aunque existe una pequeña pérdida de cooperatividad, presenta el mismo efecto hipercrómico que un DNA no sometido a estas manipulaciones, tal como se observa en la Figura 3.29.

En los complejos formados con F1 de timo de ternera lo que más llama la atención son dos hechos fundamentales: la mayor estabilidad térmica de los complejos, que se traduce en una temperatura de transición más alta, y la aparición de una bifasicidad, con dos transiciones distintas, una a temperatura semejante al DNA libre, y otra bastante superior. En la Figura 3.32 están representadas las derivadas de estas curvas de transición, obtenidas -- tal como se indicó en el apartado 2.7.5. Como se puede observar aparecen dos transiciones, una de ellas prácticamente a la misma temperatura que el DNA libre y la otra a temperaturas próximas a los 72°C, variando las proporciones relativas de DNA que se encuentran en ambas situaciones en dependencia de la relación histona/DNA del complejo. Estas proporciones se calcularon a partir de las áreas encerradas en las curvas derivadas de las curvas de transición. En la Tabla 3-XI se muestran los resultados, donde se observa que al aumentar la concentración de F1 de timo de ternera aumenta también la proporción del DNA con temperatura de transición alta. Estos datos son perfectamente concordantes con los resultados de Olins y Olins -- (1971), aunque con ligeras desviaciones que pueden ser debidas al distinto medio utilizado. Estos autores inter-

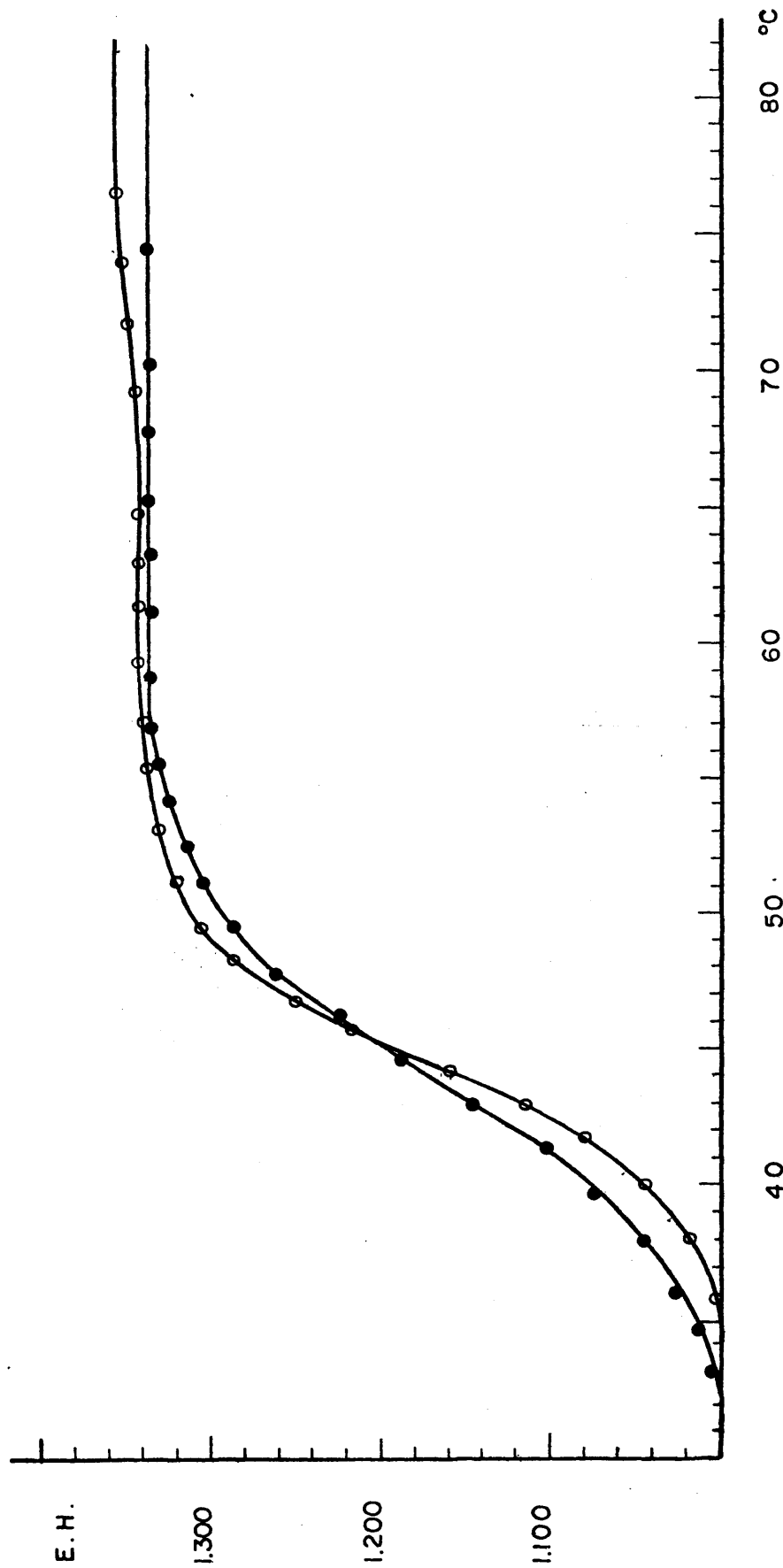


Figura 3.29 .- Curvas de transición de DNA control (●) y DNA de timo de ternera disuelto directamente en EDTA
 $2 \times 10^{-4} M$ 2 °

pretan la aparición de las dos transiciones como debidas a la existencia en el DNA de dos zonas completamente distintas, con diferentes estabilidades térmicas. La temperatura de transición más baja correspondería a zonas de DNA libre, no asociadas con histonas, mientras que la alta temperatura de transición correspondería a zonas de íntima interacción entre la histona y el DNA. Es por tanto perfectamente lógico que al aumentar la proporción de histona en relación al DNA aumente también el tanto por ciento de DNA que se encuentra en esa situación.

En la Figura 3.30 se muestran las curvas de transición correspondientes a los complejos formados con F1 de Ceratititis capitata sin agregar. En estas curvas se sigue observando la aparición de polifasicidad. En la Figura 3.33 se muestran las curvas derivadas de estas transiciones y en la Tabla 3-XI se recogen los resultados, donde aparecen las dos transiciones características que ya aparecían con F1 de timo de ternera. Sin embargo existe una diferencia bastante clara entre ambas especies de F1: la estabilización térmica del DNA producida por la asociación con F1 de Ceratititis capitata sin agregar es bastante menor. A la misma proporción histona/DNA existe mayor proporción de DNA con temperatura de transición correspondiente a DNA libre. Este hecho se puede explicar fácilmente debido a la menor carga neta de la fracción F1 de Ceratititis capitata con respecto a la F1 de timo de ternera. En efecto, Olins y Olins (1971), tal como se ha dicho anteriormente, interpretan la polifasicidad de las curvas de transición de los complejos DNA-histonas como --

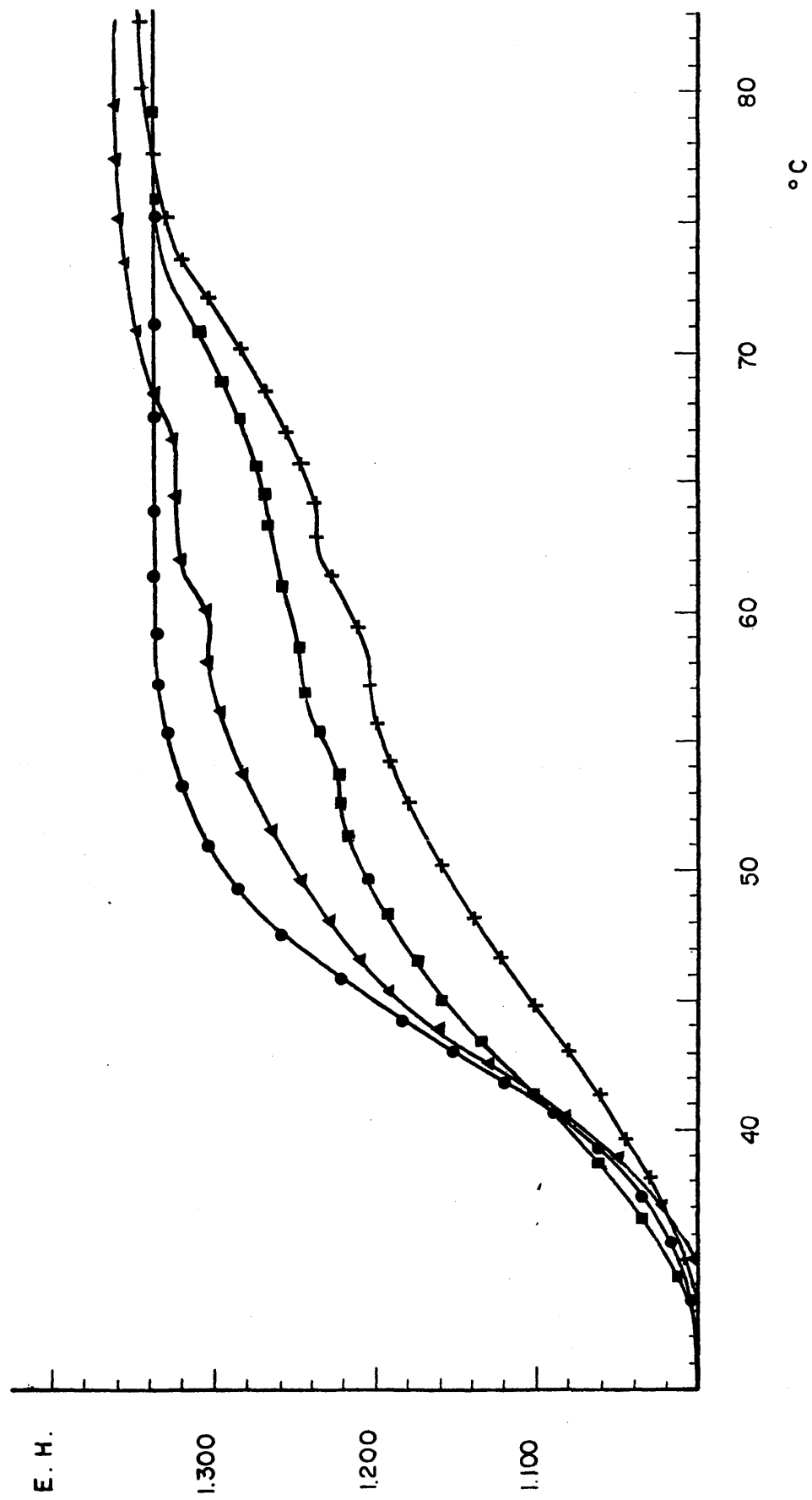


Figura 3.30 .- Curvas de transición de los complejos DNA-F1 de Ceratitis capitata sin agregar. (●) DNA control; 1.0 ▲ histone DNA 0.5

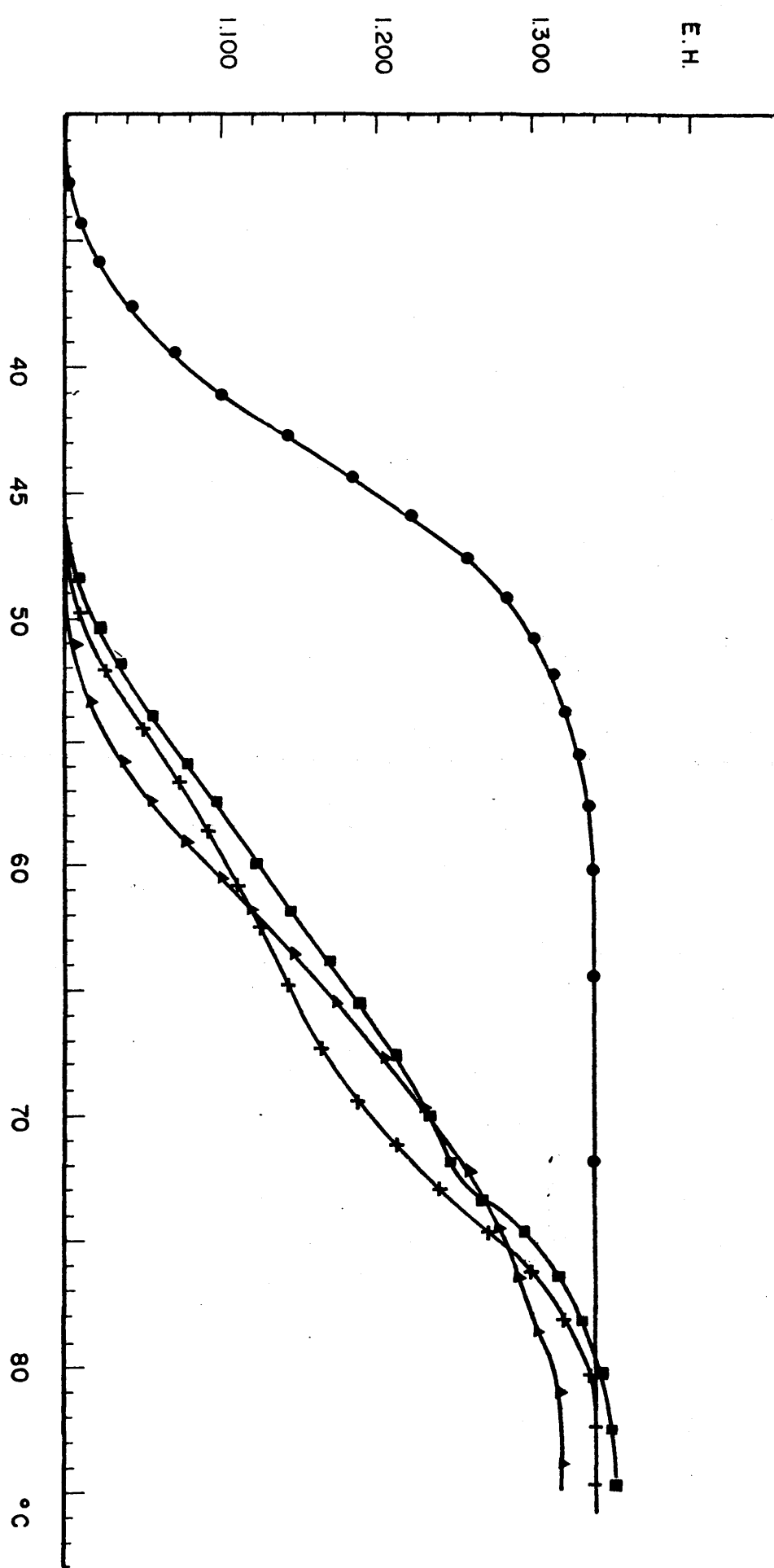


Figura 3.31.- Curvas de transición de los complejos DNA-F1 de *Ceratitis capitata* agregada. (●) DNA control; + histon DNA 1.5 . ■ histona 1 . ▲ histona DNA 0.

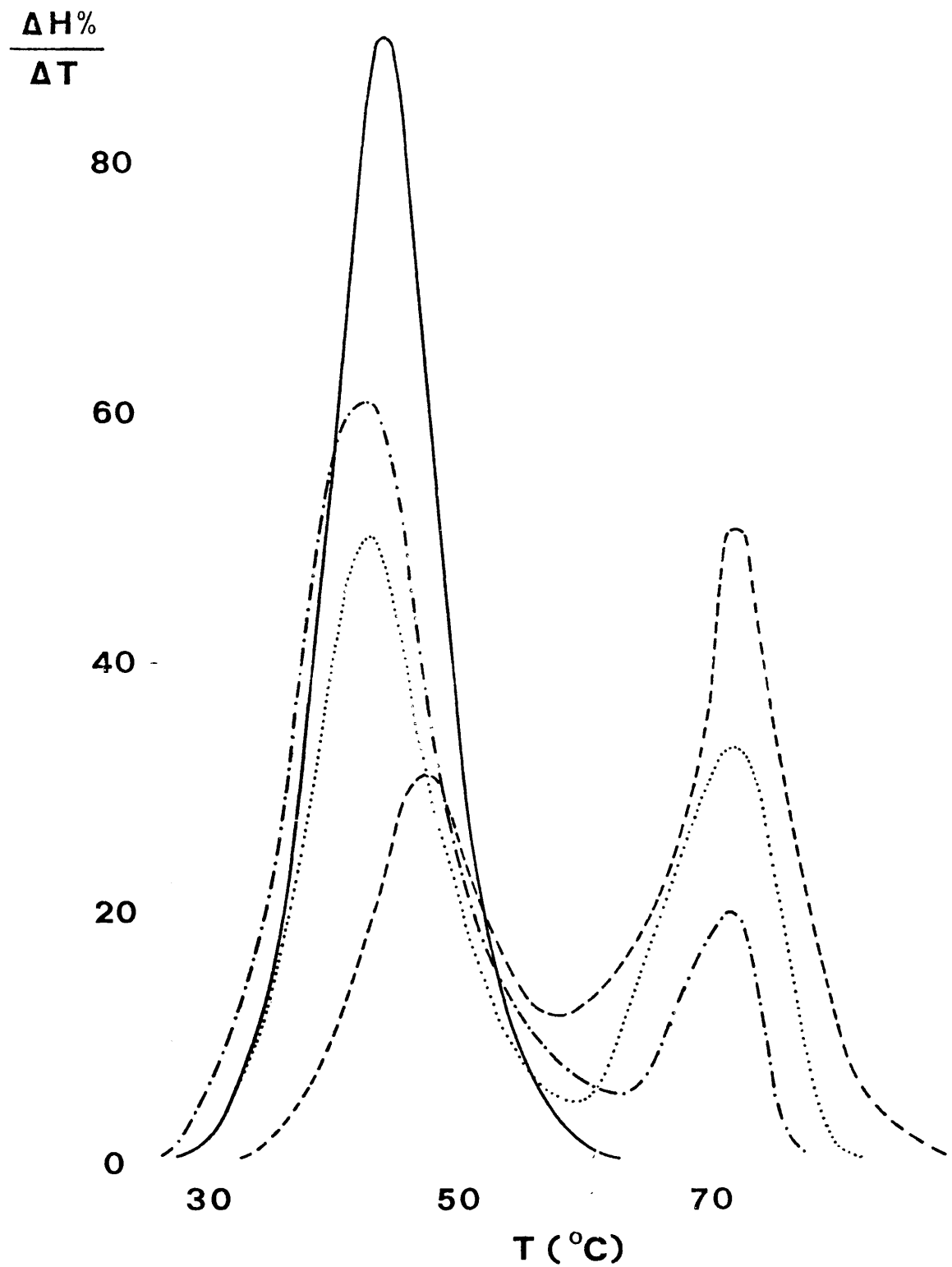


Figura 3.32.— Representación gráfica de las derivada de las curvas de transición de los complejos DNA- F1 de timo de ternera. (—) DNA control (---) histona/DNA 1.5 (···) histona/DNA 1.0 (-·-) histona/DNA 0.5

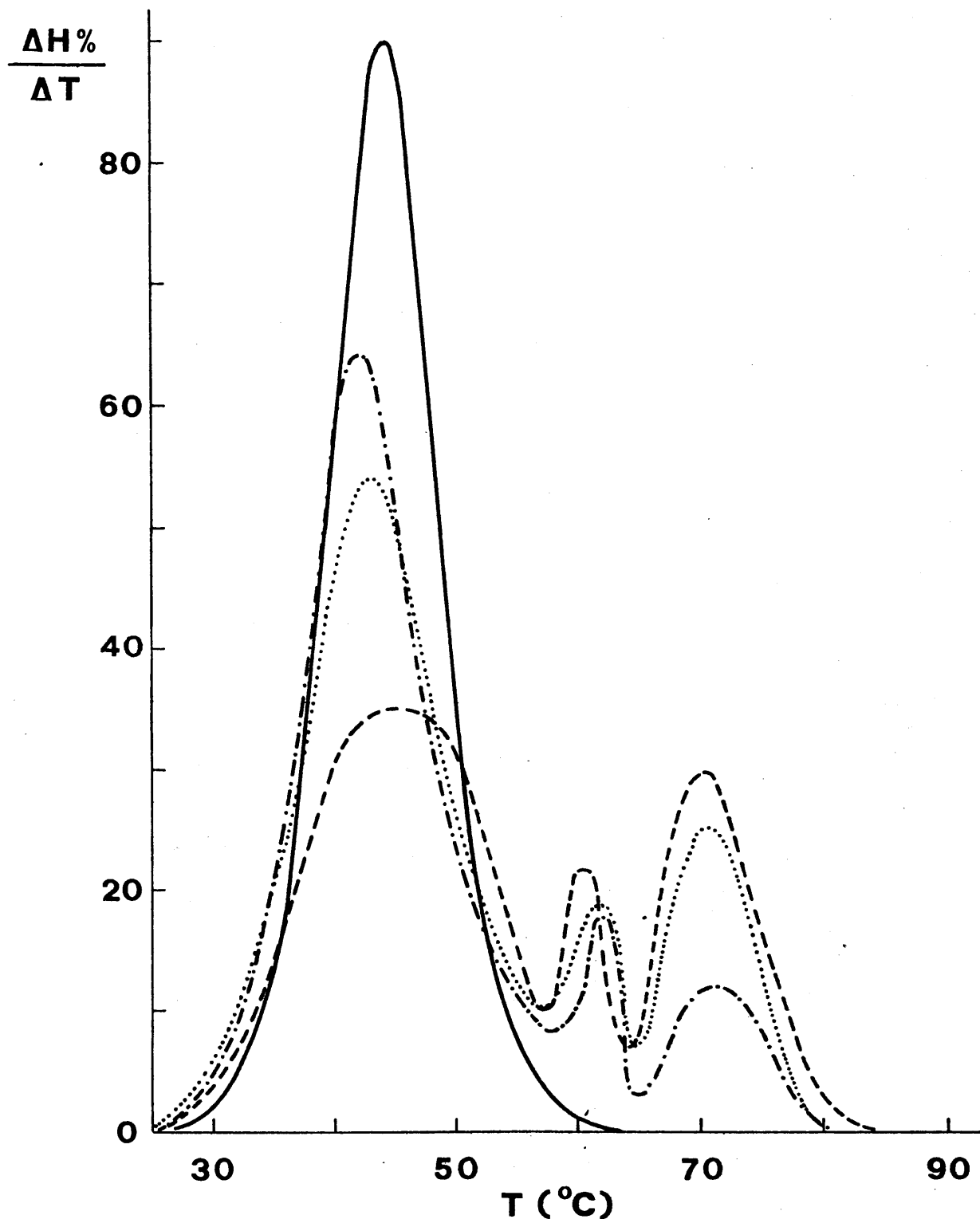


Figura 3.33.- Representación gráfica de las derivadas de las curvas de transición de los complejos DNA- Fl de Ceratititis capitata. (—) DNA control (---) histona /DNA 1.5 (...) histona/DNA 1.0 (-.-) histona/DNA 0.5

T A B L A 3-XI

Principales transiciones y correspondientes % deducidos a par
tir de las representaciones de las derivadas de las curvas de transición
frente a la temperatura.

Complejo	Relación(p/p)	1ª transición	% DNA	2ª transición	% DNA
DNA	-	44 °C	100	-	-
DNA-Fl de timo	1.5	47 °C	40	72 °C	60
mo de ternera	1.0	43 °C	64	72 °C	36
"	0.5	42 °C	84	72 °C	16
DNA-Fl Ceratidis	1.5	45 °C	60	70 °C	32
capitata	1.0	43 °C	72	70 °C	20
"	0.5	42 °C	82	70 °C	11

debida a zonas de íntima interacción entre la histona y el DNA y zonas del DNA que quedarían libres. Las zonas recubiertas de histona F1 estarían sometidas a mayor estabilización térmica y una de las principales causas de esa estabilización sería la neutralización de las cargas correspondientes a los grupos fosfato del DNA por los residuos con carga neta positiva de la histona, de modo -- que a mayor carga neta correspondería una mayor propor-- ción de DNA sometido a esta estabilización térmica.

Lo que ya no es interpretable de forma tan fácil es la aparición de una transición intermedia en el -- caso de la fracción F1 de Ceratitis capitata alrededor -- de los 61°C y que represente en todos los casos cerca -- del 8%. Esta nueva transición implica la existencia de una diferencia cualitativa fundamental entre ambas fracciones de ternera y Ceratitis capitata. Aunque no se -- puede asignar de forma biunívoca a una causa concreta no es de extrañar este comportamiento debido a las sustan-- ciales diferencias existentes en composición de aminoáci-- dos y peso molecular de ambas fracciones.

Pero sin duda el hecho más sorprendente lo constituye el efecto que tiene la agregación de la fracción F1 sobre la estabilidad térmica del DNA. Como se puede observar en la Figura 3.31 a todas las relaciones F1 agregada/DNA estudiadas tienen lugar transiciones cuantitativamente semejantes aunque parecen observarse algunas dife-- rencias cualitativas. La estabilidad térmica conseguida en este caso es mucho mayor que la correspondiente a los

complejos de F1 de tipo de ternera, y es como si a la menor concentración de F1 agregada que se utilizó (relación 0.5 histona/DNA) ya se hubiera conseguido una saturación. Como la composición de aminoácidos, y por tanto la carga neta, en esta fracción F1 agregada ha de ser idéntica a la preparación sin agregar (lo único que varía de una a otra es precisamente su estado de agregación), la razón de este cambio en la estabilización térmica del DNA hay que buscarla sin duda en la forma en la cual se lleva a cabo la interacción. Es evidente que a partir de los datos de DC no se observan variaciones en la estructura secundaria del DNA, por lo que la mayor estabilidad térmica debe estar motivada fundamentalmente al grado de organización estructural de orden superior en el complejo, como puede ser la formación de "ovillos" microscópicos que conducen a una mayor estabilidad térmica de la estructura de ble-hélice.

Por otra parte la propia agregación de la fracción F1 como consecuencia de la oxidación puede ser una causa de la complejidad de las curvas de transición que aparece en este caso. Tal como discute Ansevin y Brown (1971) la complejidad en las curvas de transición puede ser debida a la existencia de una gran microheterogeneidad en las fracciones de histonas (microheterogeneidad -- que aparece en mayor grado en la fracción F1), aunque la presencia de dímeros y polímeros superiores en el caso de la fracción F3, según estos autores introducen aún mayor complejidad. Puede ser esta la causa del efecto observado en el presente caso, ya que la agrupación de la frac--

ción F1 de Ceratitis capitata, como se ha discutido en --
precedentes secciones, tiene las mismas causas que la agre-
gación de la fracción F3, es decir, formación de puentes
disulfuros intermoleculares.

CONCLUSIONES

IV.- C O N C L U S I O N E S

=====

Dentro del contexto general del estudio de las histonas del díptero Ceratitis capitata, este trabajo se ha dirigido en una primera fase al aislamiento y caracterización molecular de las histonas de este insecto, y más específicamente al aislamiento, purificación y estudio de algunas características moleculares de la fracción F1. -- Posteriormente se realizaron estudios sobre las propiedades físicas de los complejos formados con esta fracción de histona y DNA de timo de ternera. A lo largo de estas investigaciones se han obtenido las siguientes conclusiones:

1º.- Las histonas totales de adulto farato de Ceratitis capitata se aislaron a partir de cromatina cruda por disociación salina y por extracción ácida. Mientras que la primera conducía a una preparación cuya imagen electroforética revelaba únicamente 4 bandas, la extracción ácida daba lugar a seis bandas perfectamente definidas, numeradas por orden de movilidad.

2º.- Aplicados los procedimientos descritos de fraccionamiento, y teniendo en cuenta los análisis de aminoácidos correspondientes, fue posible identificar cada una de las bandas y homologarlas con las fracciones de histonas conocidas en otras especies. Así:

a) La banda de menor movilidad electroforética (designada como banda 6) corresponde a la fracción F1.

b) La banda 5 no corresponde a una histona sino a una proteína, componente del pupario, con una anómala composición de aminoácidos y comportamiento en cuanto a sus propiedades físicas y químicas se refiere (movilidad electroforética, peso molecular y solubilidad en PCA y TCA).

c) Las bandas 4, 3, 2 y 1 se asignan como correspondientes a las fracciones F3, F2B, F2A2 y F2A1, respectivamente, teniendo las dos últimas idénticas movilidades electroforéticas y siendo muy parecidas en composición de aminoácidos a sus homólogas de timo de ternera.

3º.- La fracción F1 de Ceratitis capitata, que se separa selectivamente con PCA 5%(p/v) aparece siempre contaminada con una fracción de menor movilidad, contaminación que se elimina si la extracción se realiza con PCA 2M.

4º.- El análisis de aminoácidos de la fracción F1 de Ceratitis capitata presenta algunas características peculiares con respecto a su homóloga de timo de ternera, como es la menor proporción de residuos básicos, y la presencia de cisteína, histidina y metionina.

5º.- Esta fracción presenta menor movilidad electroforética que la correspondiente de tipo de ternera, y posee mayor peso molecular. Este hecho, junto con su menor densidad de carga puede explicar perfectamente dicha menor movilidad electroforética.

6º.- Cuando la fracción F1 de Ceratitis capitata se somete a condiciones de oxidación da lugar a agregados de alto peso molecular. El tanto por ciento de agregado formado es independiente del tiempo de agregación, quedando siempre la misma proporción de F1 sin agregar, aunque se prolongue indefinidamente el tiempo de incubación.

7º.- En una de las etapas de la oxidación de la fracción F1 de Ceratitis capitata, concretamente durante la diálisis frente a agua destilada, aparecía un precipitado que correspondía a la fracción contaminante de las preparaciones de F1 extraídas con PCA 5%. El análisis de aminoácidos de esta fracción correspondía a una proteína cuyas características no son de histona, de naturaleza bastante semejante a contaminantes de la fracción F1 aislada por otros autores en diferentes materiales.

8º.- Se consiguió separar la F1 agregada y sin agregar de Ceratitis capitata utilizando electroforesis preparativa y cromatografía en Biegel P-100, pudiéndose observar la ausencia de cisteína en la subfracción sin agregar y su posterior incapacidad de formar agregados cuando era sometida a condiciones de oxidación, así como la presencia de cisteína en las subfracciones agregadas. Este he-

cho induce a pensar en la presencia de al menos dos distintas especies moleculares componentes de la fracción F1 de Ceratitidis capitata, cuya diferencia fundamental es la presencia y ausencia de cisteína, no revelando sus análisis de aminoácido ninguna otra diferencia clara.

9º.- La extracción selectiva con sucesivas concentraciones de ClNa sobre cromatina cruda de Ceratitidis capitata en su estado de adulto farato presenta un comportamiento anormal con respecto a otros materiales observados. Esta desigualdad se manifiesta tanto en la menor fuerza iónica necesaria para separar las distintas fracciones, como en una alteración en el orden de separación de las mismas. Parece ser que la causa fundamental de esta distorsión es debida a la presencia de la proteína contaminante correspondiente a la banda 5.

10º.- La F1 de Ceratitidis capitata tiene menor capacidad para precipitar al DNA que su homóloga de timo de ternera, hecho que se puede interpretar como debido a su menor densidad de carga. En cambio, cuando se encuentra agregada, potencia en gran medida esta facultad, posiblemente debido a la mayor capacidad del agregado para entrecruzar distintas moléculas de DNA.

11º.- Tanto la F1 agregada con sin agregar de Ceratitidis capitata no parecen alterar sustancialmente la estructura secundaria del DNA. Este hecho se pudo poner de manifiesto por el estudio mediante CD de los complejos F1-DNA, formados en distintas relaciones F1/DNA. Idéntico efecto se observa con F1 de timo de ternera, estando plenamente

de acuerdo con los hechos descritos en la bibliografía.

12º.- Las curvas de transición térmica de los complejos DNA-F1 de Ceratititis capitata sin agregar presentan polifasicidad, al igual que los complejos formados con F1 de timo de ternera. Sin embargo aparecen dos hechos distintos:

a) La menor estabilización térmica del DNA en el caso de F1 de Ceratititis capitata con respecto a F1 de timo de ternera, interpretado como un efecto de la menor densidad de carga de esta fracción.

b) La aparición de una nueva transición que no tiene homóloga en los complejos formados con F1 de timo de ternera, lo que revela una diferencia cualitativa importante, posiblemente debido a la mayor complejidad molecular de esta fracción en Ceratititis capitata.

13º.- La agregación de la fracción F1 tiene como consecuencia una mayor estabilización térmica del DNA, conduciendo a curvas de desnaturalización muy complejas, pero todas ellas de altas temperaturas de transición. La complejidad de las curvas de transición ha sido observada -- por otros autores en el caso de la F3 como consecuencia de la oxidación.

14º.- Aunque a priori no se puede concluir la importancia real que "in vivo" pueda tener el fenómeno de la agregación de esta fracción de histona, no es desechable a priori la hipótesis de que juegue un papel realmente importante en la estructura y función de cromatina de insectos.

licar la presente tesis doctoral
con la censura de -
Extraseñalada "cum laude"

Madrid, 3 de junio 1976

[Signature]

Alcalá

[Signature]

[Signature]

[Signature]

[Signature]

V.- B I B L I O G R A F I A

=====

Adler, A.J.; Ross, D.G.; Chen, K., Stafford, P.A.; ---
Woiszwilllo, M.J. y Fasman, D. (1974) Biochemistry 13, 616.

Alfageme, C.R.; Zweidler, A.; Mahowald, A. y Cohen, L.H.
(1974) J. Biol. Chem. 249, 3729.

Alfrey, V.G.; Littau, V.C. y Mirsky, A.E. (1963) Proc.
Natl. Acad. Sci. US 49, 414.

Ansevin, A.T.; Hnilica, L.C.; Spelsberg, T.C. y Kehm, S.L.
(1971) Biochemistry 10, 4793.

Artman, M. y Roth, J.S. (1971) J. Mol. Biol. 60, 291.

Baner, R.D. y Jahanson, R. (1966) Biochim. Biophys. Acta
(1966) 119, 418.

Bellair, J.T. y Mauritzen, C.M. (1967) Biochim. Biophys.
Acta 133, 263.

Baldwin, J.P.; Boseley, P.G.; Bradbury, E.M. e Ibel, K.
(1975) Nature 253, 245.

- Bonner, J.; Chalkley, G.R.; Dahmus, M.; Fambrough, D.;
Fujimura, F.; Huang, R.C.; Huberman, J.; Jensen,
R.; Marushige, K.; Ohlenbusch, H.; Olivera, B.
y Widholm, J. (1968 a) en "Methods in Enzymology"
(S.P. Colowick y N.O. Kaplan eds.) vol. XII B,
p. 3. Academic Press, New York.
- Booner, J. y Tuan, D.Y.H. (1968 b) en "Structural Chemis-
try and Molecular Biology" (A. Rich y N. David
son eds.) p. 412, San Francisco, California.
- Boublig, M.; Bradbury, E.M. y Crane-Robison, C. (1970 a)
Eur. J. Bio-Chem. 14, 486.
- Boublig, M.; Bradbury, E.M.; Crane-Robison, C. y Johns, E.W.
(1970 b) Eur. J. Biochem. 17, 151.
- Bradbury, E.M. (1970) Eur. J. Biochem. 14, 481.
- Bradbury, E.M.; Crane-Robison, C.; Phillips, D.M.P.; Johns,
E.W. y Murray, K. (1965) Nature 205, 1315.
- Bradbury, E.M.; Crane-Robison, C.; Goldman, H.; Rattle, H.W.
y Stephens, R.M. (1967) J. Mol. Biol. 29, 507.
- Bradbury, E.M.; Molgaard, H.V.; Stephens, R.M.; Bolmard,
L.A. y Johns, E.W. (1972) Eur. J. Biochem. 31,
474.
- Bradbury, E.M.; Carpenter, B.G. y Rattle, H.W.E. (1973)
Nature 241, 123.

143, 67.

Brahms, J. y Mommaerts, W.F.H.M. (1964) J. Mol. Biol. 10,
73.

Bruggen, E.F.J. y Arnberg, C. (1974) Biochem. Biophys. Res.
Commun 60, 1365.

Buckingham, R.H. y Stoken, L.A. (1970 a) Biochem. J. 117,
157.

Buckingham, R.H. y Stoken, L.A. (1970 b) Biochem. J. 117,
509.

Burton, K. (1956) Biochem. J. 62, 315.

Bustin, M. y Cole, R.D. (1968) J. Biol. Chem. 243, 4500.

Bustin, M. y Cole, R.D. (1969) J. Biol. Chem. 244, 528.

Bustin, M. y Stollar, B.D. (1972) J. Biol. Chem. 247, 5716.

Butler, J.A.; Power, D.F. y Palau, J. (1967) Biochem. J.
102, 539.

Cohen, L.H. y Gotchel, B.V. (1971) J. Biol. Chem. 246, 1841.

Crampton, C.F.; Moore, S. y Stein, W.H. (1955) J. Biol.
Chem. 215, 787.

Cruft, H.J. (1961) Biochem. Biophys. Acta 54, 611.

Crick, F.M.C. y Klug, A. (1975) Nature, 255, 530.

D'Anna, J.A. e Isenberg, I. (1974) Biochemistry 13, 2093.

Dávila, C. (1965 a) J. Chromatog., 19, 382.

Dávila, C.; Charles, P. y Ledoux, L. (1965 b) J. Chromatog.,
19, 382.

Davison, P.F. y Butler, J.A.V. (1954) Biochem. Biophys. Ac
ta 15, 439.

Davison, P.F. y Shooter, K.V. (1956) Bull. Soc. Chim. Bel.
65, 85.

Delange, R.J.; Fambrough, D.M.; Smith, E.L. y Bonner, J.
(1968) J. Biol. Chem. 243, 5906.

Delange, R.J.; Fambrough, D.M.; Smith, E.L. y Bonner, J.
(1969) J. Biol. Chem. 244, 319.

Denooij, E.H. y Westenbrink, H.G.K. (1962) Biochem. Biophys.
Acta 62, 608.

Dick, C. y Johns, E.W. (1969 a) Comp. Biochem. Physiol. 31,
529.

Dick, C. y Johns, E.W. (1969 b) Biochem. Biophys. Acta 174,
380.

Dick, C. y Johns, E.W. (1969 c) Biochem. Biophys. Acta 175,
414.

Diggle, J.H. y Peacocke, A.R. (1971) FEBS Lett. 18, 138.

Dische, Z. (1930) Microchemie 8, 4.

Dwivedi, R.; Dutta, S. y Bloch, D. (1969) J. Cell. Biol.
43, 51.

Edwards, L.J. y Hnilica, L.S. (1968) Experientia 24, 228.

Elliot, T.A.; Bradbury, E.M. y Zubay, G. (1962) J. Mol.
Biol. 4, 61.

Frambrough, D.M.; Fujimura, F. y Bonner, J. (1968) Bioche-
mistry 7, 575.

Fasman, G.D.; Shaffhausen, B.; Goldsmith, L. y Adler, A.J.
(1970) Biochemistry 9, 2814.

Folin, O. y Ciocalteu, V. (1927) J. Biol. Chem. 73, 627.

France, L.; Johns, E.W. y Navlet, J.M. (1974) Eur. J. Bio-
chem. 45, 83.

Garret, R.A. (1971) Biochemistry 10, 2227.

Georgiev, G.; Ananieva, L. y Kozlov, J. (1966) J. Mol. Biol.
22, 365.

Gold, A.M. y Fahrney, D. (1964) J. Amer. Chem. Soc. 3, 783.

Hamana, K. e Iwai, K. (1971) J. Biochem. 69, 1097.

Hayashi, K.; Matsutera, E. y Ohba, Y. (1974) Biochem. Biophys. Acta 342, 185.

Hekman, A. y Sluyser, M. (1973) Biochem. Biophys. Acta 295, 613.

Hewish, D.R. y Burgoyne, L.A. (1973) Biochem. Biophys. Res. Commun, 52, 504.

Hill, R.J.; Pucia, D.L. y Doty, P. (1971) J. Mol. Biol. 61, 445.

Hindley, J. (1963) Biochem. Biophys. Res. Comm. 12, 175.

Hindley, J. (1964) Abstr. 6th Intern. Congr. Biochem., p. 1. New York.

Hnilica, L.S.H. (1964) Experientia 20, 13.

Hnilica, L.S. (1967) Progr. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 7, 25.

Hnilica, L.S.; Kappler, H.A. y Jordan, J.J. (1970) Experientia 26, 353.

Hohmann, P.; Cole, R.D. y Bern, H.A. (1971) J. Nat. Cancer Enst. 47, 337.

Hsiang, M. y Cole, R.D. (1973) J. Biol. Chem. 248, 2007.

Hsueh Jei Li (1975) Nucleic Acid Res. 2, 1275 (1975).

Hwan, J.C.; Leffak, I.M.; Li, H.J.; Huang, P.C. y Mura, C.
(1975) Biochemistry 14, 1390.

Ilyin, Y.V.A. y Georgiev, G.P. (1971) Eur. J. Biochem. 22,
235.

Iwai, K. (1964) en "The Nucleohistones" (J. Bonner y P.O.P.
Ts'o, eds.) p. 59, Holden Day, San Francisco, Ca
lifornia.

Iwai, K.; Shiomi, T. y Mita, T. (1965) J. Biochem. (Tokio)
58, 312.

Iwai, K.; Ishikawa, K. y Hayashi, H. (1970 a) Nature 226,
1056.

Iwai, K.; Hamana, K. y Yabuki, H. (1970 b) J. Biochem. 68,
597.

Jirgensons, B. y Hnilica, L.S. (1965) Biochem. Biophys.
Acta 109, 241.

Johns, E.W. (1967 a) Biochem. J. 104, 78.

Johns, E.W. (1967 b) Biochem. J. 105, 611.

- Johns, E.W. (1968 a) J. Chromatog. 33, 563.
- Johns, E.W. (1968 b) Eur. J. Biochem. 4, 437.
- Johns, E.W. (1969 a) J. Chromatog. 34, 429.
- Johns, E.W. (1969 b) en Ciba Foundation Symposium on Homeostatic Regulators (G.E.W. Wolstenholm and J. Knig eds.) p. 128, J. y A. Churchill, London.
- Johns, E.W.; Phillips, D.M.P.; Simson, P. y Butler, J.A.V. (1960) Biochem. J. 77, 631.
- Johns, E.W.; Phillips, D.M.P. y Butler J.A.V. (1961) Bioche J. 80, 189.
- Johns, E.W. y Butler, J.A.V. (1962) Biochem. J. 82, 15.
- Johns, E.W. y Forrester, S. (1969) Eur. J. Biochem. 8, 547.
- Johns, E.W. y Forrester, S. (1970) Biochem. Biophys. Acta 209, 54.
- Johns, E.W. (1971) en "Histones y Nucleohistones" (D.M.P. Phillips ed.) cap. 1, Plenum Press, New York-Lond
- Johns, E.W.; Goodwin, G.H.; Walker, J.M. y Sanders, C. (1975 en "The Structure and Function of Chromatin". Ciba Foundation Symposium 28 (New series) p. 95.
- Johnson, A. y Rothstein, P. (1970) J. Gen. Physiol. 55, 688.

- Kinkade, J.M. y Cole, R.D. (1966 a) J. Biol. Chem. 241, 5798.
- Kinkade, J.M. y Cole, R.D. (1965 b) J. Biol. Chem. 247, 5716.
- Kistler, W.S.; Geroch, M.E. y Ashman, H.G. (1973) J. Biol. Chem. 248, 4532.
- Kornberg, R.D. y Thomas, J.O. (1974) Science 184, 865.
- Kornberg, R.D. (1974) Science 184, 868.
- Kossel, A.Z. (1884) Physiol. Chem. 8, 511.
- Leaver, J.L. y Cruft, H.J. (1966) Biochem. J. 101, 665.
- Leclerc, J.; Martinage, A.; Dautrevaux, M. y Biserta, G.
(1969) Biochem. Biophys. Acta 194, 342.
- Leighton, T.J.; Dill, B.C.; Stock, J.J. y Phillips, C. (1971)
Proc. Nat. Acad. Sci. US 68, 677.
- Li, H.J. y Bonner, J. (1971) Biochemistry 10, 1461.
- Lindigkeit, R.; Bellmann, K.; Feuske, H.; Bottger, M.;
Holtzhaner, M. y Eichhorn, T. (1974) FEBS Letters
44, 146.
- Littau, V.C.; Burdick, C.J.; Allfrey, V.G. y Mirsky, A.E.
(1965 a) J. Cell. Biol. 27, 124.

Littau, V.C.; Burdick, C.J.; Allfrey, V.G. y Mirsky, A.E.
(1965 b) Proc. Nat. Acad. Sci. Wash. 54, 1204.

Loeb, J.E. (1968) Biochem. Biophys. Acta 157, 424.

Lowry, OH.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. y Randall, R.J.
(1951) J. Mol. Chem. 193, 265.

Luck, J.M.; Cook, H.A.; Eldredge, N.T.; Haley, H.I.; Kupke,
D.W. y Rasmussen, P.S. (1956) Arch. Biochem. Bio
phys. 65, 449.

Luck, J.M.; Rasmussen, P.S.; Satake, K. y Tsvetikov, A.N.
(1958) J. Biol. Chem. 233, 1407.

Makino, F. y Tsuzuki, J. (1971) Nature 231, 446.

Mauritzen, C.M. y Stedman, E. (1967) J. Biol. Chem. 242, 224

Marmur, J. (1961) J. Mol. Biol. 3, 208.

Marzluff, W.F.; Sanders, L.A.; Miller D.M. y Mac Carty, K.S.
(1972) J. Biol. Chem. 247, 2026.

Matsuyama, A.; Tagashira, Y. y Nagata, C. (1971) Biochem. Bi
phys. Acta 240, 184.

Miescher, F. (1874) Verhandl. d. Naturforsch. Ges. in Basel
6, 138.

- Mingot, F. y C.A. Dávila, C. (1974) J. Chromatog. 94, 75.
- Mohberg, J. y Rusch, H.P. (1970) Arch. Biophys. 138, 418.
- Mommaerts, N.F.H.M. (1968) Methods Enzymol. 12B, 302.
- Municio, A.M.; Odriozola, J.M. y Piñeiro, A. (1970) Comp. Biochem. Physiol. 37, 387.
- Murray, K. (1964) en "The Nucleohistones" (J. Bonner y Ts'o eds.) p. 15, San Francisco, London, Amsterdam.
- Murray, K. (1966) J. Mol. Biol. 15, 409.
- Murray, K. (1969) J. Mol. Biol. 39, 125.
- Murray, K.; Bradbury, E.M.; Crane-Robison, C.; Stephens, R.M.; Haydon, A.J. y Peacocke, A.R. (1970) Biochem. J. 120, 859.
- Neelin, J.M. y Connell, G.E. (1959) Biochem. Biophys. Acta 31, 539.
- Neelin, J.M.; Callahan, P.X.; Lamb, D.C. y Murray, K. (1964) Biochem. Physiol. 42, 1743.
- Nelson, R.D. y Yunis, J.J. (1969) Exp. Cell Res. 57, 311.
- Ohlenbusch, H.H.; Olivera, B.M.; Tuan, D. y Davidson, N. (1967) J. Mol. Biol. 25, 299.
- Noll, M. (1974) Nucleic Acids Research, 1, 1573.

Olins, A.L. y Olins, D.E. (1974) Science 183, 330.

Olins, D.E. (1969) J. Mol. Biol. 43, 439.

Olins, D.E. y Olins, A.L. (1971) J. Mol. Biol. 57, 437.

Oliver, D. y Chalkley, R. (1972 a) Exptl. Cell Res. 73, 295.

Oliver, D.; Sommer, K.R.; Panyim, S.; Spiker, S. y Chalkley, R. (1972 b) Biochem. J. 129, 349.

Palau, J. y Butler, J.A.V. (1966) Biochem. J. 100, 779.

Pallotta, D. y Berlowitz, L. (1970) Biochem. Biophys. Acta 200, 538.

Panyim, S.; Bilek, D. y Chalkley, R. (1971 a) J. Mol. Chem. 246, 4206.

Panyim, S.; Bilek, D. y Chalkley, R. (1971 b) J. Biol. Chem. 246, 7577.

Pardon, J.F.; Wilkins, M.H.F. y Richards, B.M. (1967) Natur 215, 508.

Pardon, J.F. y Wilkins, M.H.F. (1972) J. Mol. Biol. 68, 115.

Paul, J. y Gilmour, R.S. (1968) J. Mol. Biol. 34, 305.

Perera, J. (1975) Tesis Doctoral, Facultad de Químicas de la Universidad Complutense.

- Tonino, G.J.M. y Rozijin, T.H. (1966) Biochim. Biophys. Acta 124, 427.
- Yoshida, M.; Yokotsuka, K. y Shimura, K. (1966) J. Biochem. (Tokyo) 60, 586.
- Van der Westhuyzen, D.R. y van Holt, C. (1975) FEB Letters, 14, 333.
- Van Holde, K.E.; Sahasrabuddhe, C.G. y Shaw, B.R. (1974) Nucleic Acids Research, 1, 1579.
- Wagner, T. y Spelberg, T.C. (1971) Biochemistry 10, 2599.
- Webb, J.M. y Levy, H.B. (1958) Methods of Biochem. Anal. 6, 1.
- Wickett, R.R.; Li, H.J. e Isenberg, I. (1972) Biochemistry 11, 2952.
- Wilhelm, X. y Champagne, M. (1969) Eur. J. Biochem. 10, 102.
- Winterberger, V.; Smith, P. y Letnansky, K. (1973) Eur. J. Biochem. 33, 123.
- Wilkins, M.H.F. (1964) Gordon Research Conference en Cell Structure and Metabolism. New Hampshire.